

**Leber-Fibrose:  
Erstellung eines Modells zur Analyse lebertoxischer Substanzen  
und  
Analyse der *Itbp1*-abhängigen Aktivierung hepatischer Sternzellen**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologe  
Sebastian Mathias Knöbel  
aus Bonn

Berichter: PD Dr. Ralf Weiskirchen  
PD Dr. Christoph Peterhänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2006

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Die Arbeit wurde bei der Miltenyi Biotec GmbH (Köln) in Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der RWTH Aachen durchgeführt.

**Meinen Eltern und meinem Großvater**

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Die Leber</b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Anatomie der Leber .....	2
2.1.2 Mikroskopische Struktur des Sinusoids.....	3
2.1.3 Funktion der parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen .....	4
2.1.3.1 Hepatozyten.....	4
2.1.3.2 Hepatische Sternzellen (HSC) .....	5
2.1.3.3 Weitere hepatische Zelltypen .....	6
2.1.4 Embryonalentwicklung der Mausleber .....	7
<b>2.2 Leber-Fibrose</b> .....	<b>9</b>
<b>2.3 <i>in-vitro</i>-Leber-Toxizitäts-Assays zur Identifizierung leberschädigender Substanzen</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4 <i>in-vitro</i>-Differenzierung (IVD) von embryonalen Stammzellen zu Hepatozyten</b> .....	<b>11</b>
<b>2.5 Die Bedeutung von TGF-<math>\beta</math> für die Aktivierung von HSC</b> .....	<b>13</b>
<b>2.6 LTBP1: Kontrolle der TGF-<math>\beta</math> Bioverfügbarkeit</b> .....	<b>14</b>
<b>2.7 <i>in-vitro</i>-Transdifferenzierung von HSC</b> .....	<b>15</b>
<b>3 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>17</b>
<b>4 ERGEBNISSE</b> .....	<b>18</b>
<b>A ERSTELLUNG EINES MODELLS ZUR ANALYSE LEBERTOXISCHER SUBSTANZEN</b> .....	<b>18</b>
<b>4.1 Herstellung einer transgenen ES-Zelllinie mit konstitutiver, transmembranärer EGFP-Expression</b> .....	<b>18</b>
4.1.1 Klonierung des Expressionsvektors <i>pDisplay-egfp</i> .....	18
4.1.2 Herstellung transgener muriner <i>pDisplay-egfp</i> -ES-Zellen .....	19
4.1.3 Funktionelle Analyse der EGFP-Expression in stabilen <i>pDisplay-egfp</i> -ES-Zell-Transfektanten.....	20
4.1.3.1 Laser-Scan-Mikroskopie (LSM).....	20
4.1.3.2 Durchflusszytometrie .....	21
4.1.3.3 Nachweis der extrazellulären Präsentation von EGFP .....	22
4.1.3.4 Magnetische Zell-Sortierung (MACS) von ES-Zellen mit konstitutiver EGFP-Expression.....	23



<b>4.2 Herstellung einer transgenen ES-Zelllinie mit hepatozytenspezifischer, transmembranärer EGFP-Expression .....</b>	<b>24</b>
4.2.1 Northern-Blot-Analyse zur Gewebsspezifität der <i>albumin</i> -Expression in der Maus .....	27
4.2.2 Klonierung eines hepatozytenspezifischen Expressionsvektors .....	28
4.2.2.1 Klonierung des <i>albumin</i> Promotors und Enhancers .....	28
4.2.2.2 Klonierung des finalen Expressionsvektors <i>pTRANS</i> .....	31
4.2.3 Funktionelle Analyse des Expressionsvektors in der murinen Hepatomzelllinie HEPA-1-6 .....	32
4.2.3.1 Nachweis der <i>egfp</i> -Transkription in transgenen HEPA-1-6-Zellen.....	32
4.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie .....	33
4.2.3.3 Durchflusszytometrie .....	33
4.2.4 Herstellung transgener <i>pTRANS</i> -ES-Zelllinien zur Etablierung und Optimierung der <i>in-vitro</i> -Differenzierung von ES-Zellen zu Hepatozyten .....	35
<b>4.3 <i>in-vitro</i>-Differenzierung von murinen ES-Zellen zu Hepatozyten .....</b>	<b>36</b>
4.3.1 Etablierung eines <i>in-vitro</i> -Differenzierungsprotokolls .....	36
4.3.1.1 Morphologische Eigenschaften hepatozytenartiger Vorläuferzellen .....	36
4.3.1.2 Genexpressions-Analyse zur <i>in-vitro</i> -Differenzierung (IVD) .....	37
4.3.2 Analyse der Transgenexpression in stabil transfizierten ES-Zell-Klonen .....	39
<b>4.4 Herstellung transgener Mäuse durch Vorkerninjektion .....</b>	<b>42</b>
4.4.1 Genotypisierung .....	43
4.4.2 Analyse der Transgen-Transkription <i>in vivo</i> .....	44
4.4.3 EGFP-Immunpräzipitations (IP)-Western-Blot-Analyse von Leber-Lysaten.....	45
<b>4.5 Gene Targeting des <i>albumin</i>-Locus zur <i>albumin</i>-abhängigen Expression von transmembranärem EGFP.....</b>	<b>47</b>
4.5.1 Klonierungsstrategie .....	49
4.5.2 Herstellung und Analyse rekombinanter ES-Zell-Klone.....	51
<b>B ANALYSEN ZUR ROLLE DES <i>LTBP1</i>-GENS BEI DER TRANSDIFFERENZIERUNG VON HSC <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i>. .....</b>	<b>53</b>
<b>4.6 Identifikation von <i>ltbp1</i>-Transkript-Varianten.....</b>	<b>54</b>
<b>4.7 Analyse des Transdifferenzierungspotentials von WT und <i>ltbp1</i><sup>-/-</sup>-HSC <i>in vitro</i> .....</b>	<b>55</b>
4.7.1 Validierung der HSC-Zellpräparation durch Immunfluoreszenz .....	56
4.7.2 Genexpressions-Analysen .....	56
4.7.2.1 Differentielle Genexpression von aktivierten und ruhenden HSC <i>in vitro</i> .....	57
4.7.2.2 Differentielle Genexpression in WT- und <i>ltbp1</i> <sup>-/-</sup> -HSC nach <i>in-vitro</i> -Aktivierung .....	58
4.7.3 Validierung der Microarray-Analyse durch semi-quantitative RT-PCR-Analysen .....	65
4.7.4 Analyse der <i>ltbp1</i> -abhängigen Transdifferenzierung <i>in vivo</i> .....	66
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>68</b>

---

<b>6</b>	<b>AUSBLICK.....</b>	<b>80</b>
<b>7</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>82</b>
7.1	Enzyme, Antikörper und rekombinante Proteine.....	82
7.2	Chemikalien + Lösungen.....	82
7.3	Reagenziensätze.....	83
7.4	Sonstige Materialien .....	83
7.5	Geräte .....	83
7.6	Verwendete Computerprogramme .....	84
7.7	Bakterienstämme.....	85
7.8	Zelllinien.....	85
7.9	Plasmide.....	86
7.10	Größenstandards.....	87
7.11	Primer (Oligodesoxyribonukleotide).....	88
7.12	Medien und Lösungen .....	90
7.13	Molekularbiologische Methoden.....	90
7.13.1	RNA-Präparation.....	90
7.13.2	DNA-Präparation.....	91
7.13.2.1	Plasmid-Minipräparation .....	91
7.13.2.2	Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien.....	91
7.13.2.3	Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen.....	91
7.13.3	Radioaktive Markierung von DNA .....	92
7.13.4	Southern- und Northern-Blotting.....	92
7.13.5	Reverse Transkription und RT-PCR.....	93
7.13.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	94
7.13.7	DNA-Sequenzierung.....	97
7.13.8	Klonierung .....	98
7.13.8.1	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	98
7.13.8.2	<i>tailing</i> von PCR-Amplifikaten.....	98
7.13.8.3	Herstellung von DNA-Hybriden zur Generierung eines synthetischen Polylinkers.....	98
7.13.8.4	Dephosphorylierung von Vektoren mit <i>alkalischer Phosphatase</i> .....	99
7.13.8.5	Generierung von <i>blunt-ends</i> durch <i>Klenow</i> -Behandlung .....	99
7.13.8.6	Ligation .....	99
7.13.8.7	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen .....	99
7.13.9	Microarray-Analysen.....	100

---

<b>7.14 Proteinchemische Methoden</b> .....	<b>101</b>
7.14.1 Protein-Präparation.....	101
7.14.2 Bestimmung von Protein-Konzentration.....	101
7.14.3 Immunpräzipitation .....	101
7.14.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (PAGE).....	102
7.14.5 Western-Blotting .....	102
7.14.6 Herstellung von Antikörper-Allophycocyanin-(APC)-Konjugaten .....	103
7.14.7 Immunfluoreszenz.....	104
<b>7.15 Zellbiologische Methoden:</b> .....	<b>105</b>
7.15.1 Kultivierung von HEPA 1-6-Zellen .....	105
7.15.2 Kultivierung und Transdifferenzierung von HSC .....	105
7.15.3 Kultivierung von R1-ES-Zellen.....	106
7.15.4 Kultivierung von HM1-ES-Zellen.....	106
7.15.5 Generierung transgener Zelllinien durch Elektroporation .....	107
7.15.5.1 <i>in-vitro</i> -Differenzierung von HM1-ES-Zellen zu Hepatozyten.....	107
7.15.5.2 Präparation von HSC.....	108
<b>7.16 Gallengangsligatur</b> .....	<b>109</b>
<b>7.17 Gewebsschnitte</b> .....	<b>110</b>
<b>7.18 Sirius-Rot-Färbungen</b> .....	<b>110</b>
<b>7.19 Mikroskopische Verfahren</b> .....	<b>110</b>
7.19.1.1 Laser-Scan-Mikroskopie (LSM).....	111
7.19.1.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie .....	111
<b>7.20 Immunmarkierung von Zellen für MACS und FACS</b> .....	<b>111</b>
7.20.1 Signalamplifikation mit dem APC-FASER-Kit.....	112
<b>7.21 Magnetische Zellseparation (MACS)</b> .....	<b>112</b>
<b>7.22 Durchflusszytometrie (FACS)</b> .....	<b>113</b>
<b>7.23 Mäusezucht und -haltung</b> .....	<b>115</b>
<b>7.24 Mausstämme</b> .....	<b>115</b>
<b>7.25 Gewinnung, Manipulation und Reimplantation von Oozyten</b> .....	<b>115</b>
<b>8 ANHANG</b> .....	<b>117</b>
<b>9 LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>119</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

APC	Allophycocyanin
BSA	Rinderserumalbumin
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES-Zelle	embryonale Stammzelle
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
gDNA	genomische DNA
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
IVD	<i>in-vitro</i> -Differenzierung
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N-2-Ethansulfonsäure
kb	kilo Basenpaare
kD	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
M	Molar
m	milli
μ	Mikro
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NCS	Serum vom neugeborenen Kalb
<i>neo</i> <sup>R</sup>	<i>neomycin-phosphotransferase</i> -Gen
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
p.c.	post coitum
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptions-PCR-Analyse
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SMCC	Succinimidyl 4 (N-maleinimidomethyl) cyclohexan 1-carboxylat
UV	ultravioletes Licht
ÜN	über Nacht
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
V	Volt
W	Watt
mA	Milliampere

## 1 Zusammenfassung

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels und gleichzeitig die größte Drüse des Säugetierorganismus. Ein Ausfall der Leberfunktion nach chronischer Schädigung, beispielsweise durch Infektionen oder toxische Substanzen, hat allerdings drastische Konsequenzen für den Organismus. Daher fällt der Erforschung der Ursachen und Pathogenese von Lebererkrankungen eine wichtige Rolle zu.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Projekte aus dem Themenkomplex Leber-Fibrose bearbeitet. Im ersten Teil der Arbeit wurde versucht, einen hepatozytenspezifischen transgenen Oberflächenmarker (EGFP) zu etablieren, um aus *in-vitro*-differenzierten ES-Zellen spezifisch hepatische Vorläuferzellen zu isolieren und diese für *in-vitro*-Toxizitäts-Assays einsetzen zu können. Nach der Validierung der angestrebten Isolierungsmethode (MACS), wurde ein Reporterkonstrukt mit *albumin*-Promotor-getriebener Selektionsmarker-Expression kloniert und hinsichtlich der Expressionsspezifität *in vitro* und *in vivo* untersucht. In der murinen Hepatomzelllinie HEPA-1-6 konnte die Funktionalität des Konstruktes nachgewiesen werden. In verschiedenen ES- Zellklonen führte das Konstrukt jedoch zu unspezifischer Basalexpression und lieferte auch nach Differenzierung der ES-Zellen zu hepatozytenartigen Zellen keine nennenswerten Mengen an EGFP-Protein. In einem durch Oozyteninjektion generierten Mausmodell führte das Konstrukt ebenfalls zur Expression nur geringster Mengen an EGFP. Ein parallel verfolgter *knock-in*-Ansatz zur gerichteten Integration des Selektionsmarkers in das ES-Zell-Genom unter Kontrolle des natürlichen *albumin*-Locus lieferte keine positiven Klone.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des *latent transforming growth factor beta binding protein 1* (LTBP1) auf die Aktivierung bzw. Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen (HSC) *in vitro* und *in vivo* untersucht, einem für die Pathogenese der Leber-Fibrose entscheidendem Prozess. Als Grundlage diente eine *ltbp1*-defiziente Maus, bei der beide bekannten Protein-Isoformen LTBP1-L und LTBP1-S fehlen. Die nähere Charakterisierung führte zur Identifikation einer neuen Spleissvariante der *ltbp1*-mRNA, die in analoger Form bei Mensch und Ratte vorkommt. Durch Microarray-Analysen konnte eine verringerte Tendenz zur *in-vitro*-Transdifferenzierung *ltbp1*-defizienter HSC nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden - neben bekannten Markergenen für aktivierte HSC – weitere, noch nicht beschriebene Markergene identifiziert. Anschließende *in-vivo*-Studien in einem experimentellen Modell zur Induktion der Leber-Fibrose bestätigten die aus der *in-vitro*-Studie abgeleitete Hypothese einer verminderten Transdifferenzierungsneigung von *ltbp1*-defizienten HSC in fibrosierenden Lebererkrankungen, die sich in einer verminderten Kollagendeponierung durch HSC im Leberparenchym der *knock-out*-Tiere äußerte. Die Studie gewährt somit Einblick in die Rolle des LTBP1 während der Pathogenese der Leber-Fibrose und betont seine klinische Relevanz, die durch weitere Analysen zu bestätigen sein wird.

## 2 Einleitung

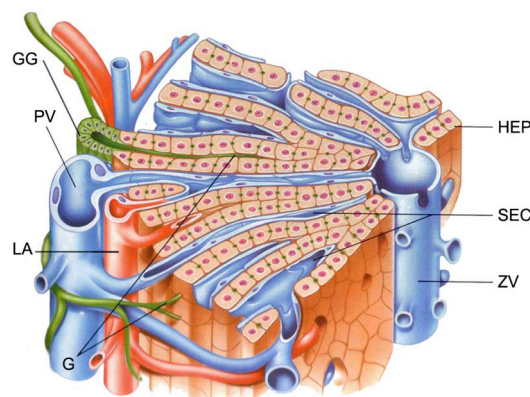
### 2.1 Die Leber

Die Leber ist das zentrale Organ des Stoffwechsels und gleichzeitig die größte Drüse des Säugetierorganismus. Sie erfüllt viele lebenswichtige Aufgaben, wie die Verarbeitung chemischer Substanzen und deren Speicherung und Abgabe, den Abbau von Stoffwechselprodukten und Giften und die Herstellung und Abgabe von Gallenflüssigkeit (Bassermann 1994). Erkrankungen der Leber können bis zu einem gewissen Grad aufgrund ihrer enormen Kapazität und Regenerationsfähigkeit kompensiert werden. Ein Ausfall der Leberfunktion nach chronischer Schädigung, beispielsweise durch Infektionen oder toxische Substanzen, hat allerdings drastische Konsequenzen für den Organismus. Daher fällt der Erforschung der Ursachen und Pathogenese von Lebererkrankungen eine wichtige Rolle zu.

#### 2.1.1 Anatomie der Leber

Die Leber wird durch zwei Gefäßsysteme versorgt, zum einen durch das normale arteriovenöse Gefäßsystem, zum anderen durch das so genannte Pfortadersystem. Über dieses Pfortadersystem muss das aus den Eingeweiden stammende, nährstoffreiche Blut zunächst das Lebergewebe passieren, bevor es wieder über die Lebervene in den Kreislauf gelangt.

Das älteste Konzept zur strukturellen Gliederung beruht auf intensiven mikroskopischen Analysen der Schweineleber durch Kiernan im Jahre 1833 (Kiernan 1833). Die Nomenklatur Kiernans wird bis heute in der Literatur verwendet und kann daher zur grundsätzlichen Beschreibung des Aufbaus der Säugetierleber herangezogen werden.



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines Leberläppchens (*lobus hepatici*) nach Benner (1996).** Im Portalfeld (links) verlaufen Äste der Portalvene (PV), Leberarterie (LA) und des Gallengangs (GG) (portale Triade). Die Zentralvene (ZV) stellt das Zentrum eines *lobules* dar. Sinusoide verbinden PV und LA mit der ZV. HEP: Hepatozyten, G: Gallencanaliculi bzw. Hering-Kanäle.

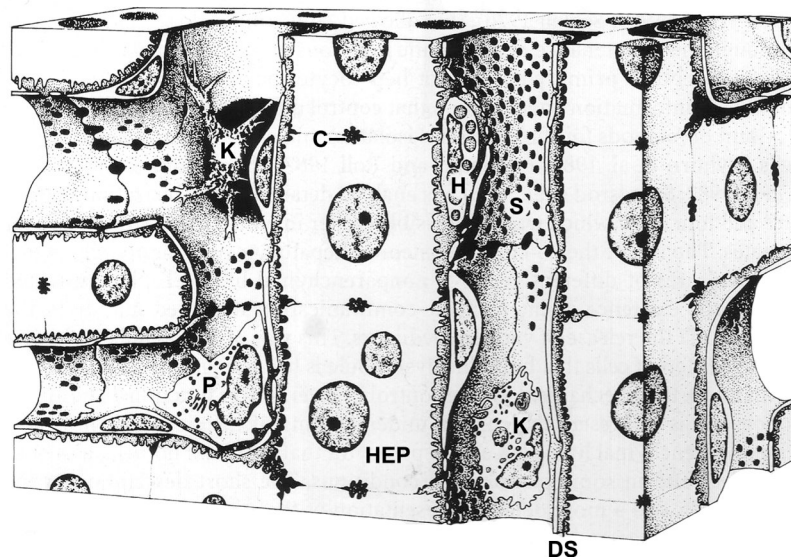
Die Maus verfügt über fünf große und zwei kleine Leberlappen (lat.: *lobus*). Innerhalb der *lobes*, die um die Hauptzweige der Portalvene organisiert sind, bilden die so genannten Leberläppchen (lat.: *lobulus hepatici*) die kleinste Struktureinheit der Leber. Die Leberläppchen sind polygonale, in der Regel hexagonale Bereiche aus Parenchym, bestehend aus einem Labyrinth untereinander verbundener Platten von Hepatozyten, die durch endothel ausgekleidete Sinusoide voneinander getrennt sind (Guyot et al. 2006). Jeder *lobule* wird von einer zentralen Struktur durchkreuzt, der Zentralvene (terminale hepatische Vene oder zentrolobuläre Vene). Die Hepatozytenplatten radiieren ausgehend von der Zentralvene in die Peripherie des Leberläppchens. In den Ecken des Polygons befinden sich die Portalfelder mit der so genannten portalen Triade, den interlobulären Verzweigungen der hepatischen Arterie, der Portalvene (vom Darm kommend) und Gallengängen. Zusätzlich verlaufen lymphatische Gefäße und Nerven in den Portalfeldern. Schmale Streifen von Bindegewebe verbinden die Portalfelder und begleiten afferente arterielle und venöse Gefäßverzweigungen, die - zwischen den Leberläppchen gelegen - die Versorgung der Sinusoide sicherstellen, durch die das Blut schließlich in die Zentralvene gelangt. Die Bindegewebsstreifen sind bei den meisten Labortieren jedoch nur schwach ausgebildet und erschweren die Identifizierung benachbarter Leberläppchen (Matsumoto & Kawakami 1982, Teutsch et al. 1999)

Das modernere Acinus-Konzept (Rappaport 1976, Rappaport et al. 1954) bei dem die Verbindungsachse zwischen den Portalfeldern das Zentrum der Struktureinheit darstellen, versucht in erster Linie, neben der endokrinen Funktion der Leber, die mit der Zentralvene als Zentrum des Leberläppchens betont wird, auch die exokrine Funktion der Leber (Gallensekretion) zu berücksichtigen. Darüber hinaus erklärt die Gliederung in den Acinus, als kleinste hepatische Mikrozirkulationseinheit, die Heterogenität verschiedener Leberzelltypen in der periportal, intermediären und perivenösen Zone u. a. durch Sauerstoff-, Nährstoff-, und Hormongradienten (Rappaport 1976).

### 2.1.2 Mikroskopische Struktur des Sinusoids

Mikroskopisch betrachtet besteht die Leber aus einschichtigen Hepatozyten-Platten, die sich von den periportal bis zu den perivenösen Bereichen erstrecken. Der 0,5 bis 2 µm breite Disse-Spalt (MacPhee et al. 1995) trennt die Hepatozyten von den sinusoidalen Endothelzellen (SEC), die eine Barriere zu den durchschnittlich 5-7 µm breiten Sinusoiden bilden. Sinusoide sind eine einzigartige Form der Kapillare, die das arterielle und venöse Blut zu terminalen Ästen der Lebervene leiten. Charakteristisch ist die durchgängige Auskleidung mit stark fenestrierten SEC. Diese *fenestrae* haben einen Durchmesser von durchschnittlich 160 nm und kommen als Ansammlung von 10 bis zu 50 Poren vor (Wisse 1972) durch welche die einzige Verbindung der perisinusoidalen Zellen mit dem Lumen der Sinusoide

besteht. Die fehlende Basallamina der SEC erlaubt einen schnellen Austausch azellulärer Komponenten zwischen Blut und Hepatozyten. Innerhalb des Lumens der Sinusoide befinden sich leberresidente Makrophagen, die Kupffer-Zellen (Kupffer 1876), die mit zytoplasmatischen Fortsätzen die *fenestrae* durchdringen und so in den Disse-Spalt reichen können. Innerhalb des Disse-Spalts befinden sich die hepatischen Sternzellen (HSC, Synonyme: Ito-Zellen, Fettspeicherezellen, Lipozyten, Vitamin A reiche Zellen, perisinusoidale Zellen), die durch lange zytoplasmatische Ausläufer in Kontakt zu mehreren Hepatozyten stehen, die ihrerseits mit einer Vielzahl von Mikrovilli in den Disse-Spalt ragen. Zwei Hepatozyten bilden jeweils durch Einstülpungen der lateralen Plasmamembranen die so genannten Gallencanaliculi, die sich im canalicular-ductularen Bereich zu den Hering-Kanälen erweitern und schließlich an der Peripherie des Leberläppchens in die Gallekanälchen übergehen, die von Cholangiozyten gebildet werden.



**Abb. 2: Schematische Darstellung der Leber-Mikrostruktur nach Sasse (1992).** C: Gallencanaliculi, DS: Disse-Spalt, H: HSC, HEP: Hepatozyten, K: Kupffer-Zellen, P: Pit-Zellen.

## 2.1.3 Funktion der parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen

### 2.1.3.1 Hepatozyten

Hepatozyten, die so genannten parenchymalen Leberzellen, können als die zentralen hepatischen Effektorzellen angesehen werden, da der Hauptteil der Leberfunktionen auf ihre Aktivität zurückzuführen ist (Jungermann 1995, Blouin et al. 1977). Hepatozyten sind polarisierte epitheliale Zellen, die sowohl endokrine als auch exokrine Eigenschaften aufweisen (Zhao & Duncan 2005), (Tab 1). Viele Hepatozyten sind typischerweise zwei- oder mehrkernig (polyploid). Substrat- und Metabolitgradienten entlang des Blutflusses bewirken



eine funktionelle und morphologische Heterogenität von Hepatozyten. Die periportalen Bezirke mit dem afferenten Blutstrom zeichnen sich durch höhere Aktivität des Glykogenabbaus, der Gluconeogenese, der Fettsäureoxidation, der Harnstoffbildung aus Aminosäurestickstoff sowie der Gallensäure- und Bilirubinausscheidung aus. Die perivenöse Zone hingegen stellt den bevorzugten Ort der Glykogensynthese, der Glykolyse, Lipogenese, der Harnstoffbildung aus Ammoniak und der Biotransformation körpereigener und körperfremder Stoffe dar (Löffler & Petrides 2006). Hepatozyten sind aber auch das Hauptziel lebertoxischer Agenzien (biologischer oder chemischer Art) und ihre Verletzung führt zu akuten oder chronischen Lebererkrankungen (Kmieć 2001).

### 2.1.3.2 Hepatische Sternzellen (HSC)

Hepatische Sternzellen (HSC), die zu den nicht-parenchymalen Zellen der Leber zählen, weisen eine charakteristische sternförmige Morphologie auf, die durch lange zytoplasmatische Ausläufer gekennzeichnet ist und für die Namensgebung verantwortlich ist (Wake 1971). Acht bis zehn HSC liegen entlang eines Sinusoids zwischen der zentrolobulären Vene (*central vein*) und dem Portalfeld (*portal tract*) im Disse Spalt. Der Nukleus-zu-Nukleus-Abstand benachbarter HSC beträgt ca. 40 µm (Guyot et al. 2006). Aufgrund ihres engen Kontakts zu den Sinusendothelzellen entlang des Sinusoids und der Expression von Markern der glatten Muskulatur werden ihnen perizytenähnliche Aufgaben, d.h. eine Rolle bei der Regulierung der Gefäßweite, zugeschrieben (Blomhoff & Wake 1991, Pinzani 1995). Ein weiteres Charakteristikum, das zur früheren Namensgebung (Fettspeicherzellen) geführt hat, sind die zytoplasmatischen Vitamin-A-Lipidtröpfchen, die in ca. 75% aller HSC präsent sind (Sztark et al. 1986) und insgesamt 80% des Körper-Retinoid-Gehalts (in Form von Retinyl-Palmitat) enthalten. Unter physiologischen Bedingungen spielen HSC eine wichtige Rolle bei der Regulation der Retinoid-Homöostase (Senoo 2004). Unter pathophysiologischen Bedingungen einer akuten oder chronischen Lebererkrankung vollziehen HSC eine Transformation (Aktivierung, Transdifferenzierung) zu Myofibroblasten (MFB) und sind neben weiteren MFB-Vorläuferzellen, u. a. für die exzessive Ablagerung und Modulierung von Extrazellulärmatrix-Komponenten von Bedeutung (Guyot et al. 2006).

**Tab. 1: Hauptfunktionen der Leber (modifiziert nach Jungermann (1995))**

Zentrum des Metabolismus:	Energie-Versorgung des Organismus Glukose-Aufnahme und -Freisetzung Aminosäure-Aufnahme und -Freisetzung Harnstoff-Produktion Lipid-Prozessierung und -Synthese Ketonkörper-Bildung Biosynthese- und -Degradation Plasmaprotein-Synthese und -Degradation Gallenbildung (Exkretion von Endo- und Xenobiotika)
Kontrolle des hormonellen Systems:	Inaktivierung und Eliminierung von Hormonen und Mediatoren Synthese und Ausschüttung von (Pro)-Hormonen Synthese von Hormon-Bindeproteinen
Abwehrzentrum:	Metabolismus von Xenobiotika, Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) Phagozytose Aufnahme und Zerstörung von Bakterien, Viren, Parasiten, Partikeln und Makromolekülen Eliminierung von Tumorzellen Akut-Phase-Reaktion
Immunregulatorische Funktion:	Antigen Präsentation für Lymphozyten Entfernung von apoptotischen Lymphozyten Toleranz-Induktion gegenüber oralen Antigenen
sonstige Funktionen:	Bildung und Aufrechterhalten der Organstruktur Synthese und Degradierung von Komponenten der ECM Blut-Reservoir: passive und aktive Blutspeicherung Beteiligung an der Regulierung des Blut-pHs Hematopoetische Funktion im fötalen und möglicherweise auch im postnatalen Leben

### 2.1.3.3 Weitere hepatische Zelltypen

Neben ihrer zentralen Rolle als metabolisches Zentrum des Körpers übt die Leber eine Vielzahl anderer Funktionen aus (Kmieć 2001) und ist unter anderem bei der Immunabwehr und -regulation und als Regulator des Hormonsystems von großer Bedeutung (Tab. 1). Die immunologische Kompetenz der Leber ist in erster Linie auf die nicht-parenchymalen Zellen zurückzuführen:

Die **Kupffer-Zellen** repräsentieren die größte Population von Gewebs-Makrophagen im Körper (Naito et al. 2004, Bouwens et al. 1986) und reinigen das postmesenterische Blut von vom Darm kommenden Bakterien, Viren und Parasiten, Partikeln, fremden oder alten Zellen (Wake, 1989) sowie Tumorzellen (Gardner et al. 1991) und bakteriellen Toxinen (Fox et al. 1988, Fox et al. 1989). Überdies spielen Kupffer-Zellen eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Leber, da sie durch parakrine Mechanismen, insbesondere mit Hepatozyten und hepatischen Sternzellen kommunizieren (Gressner 1998).

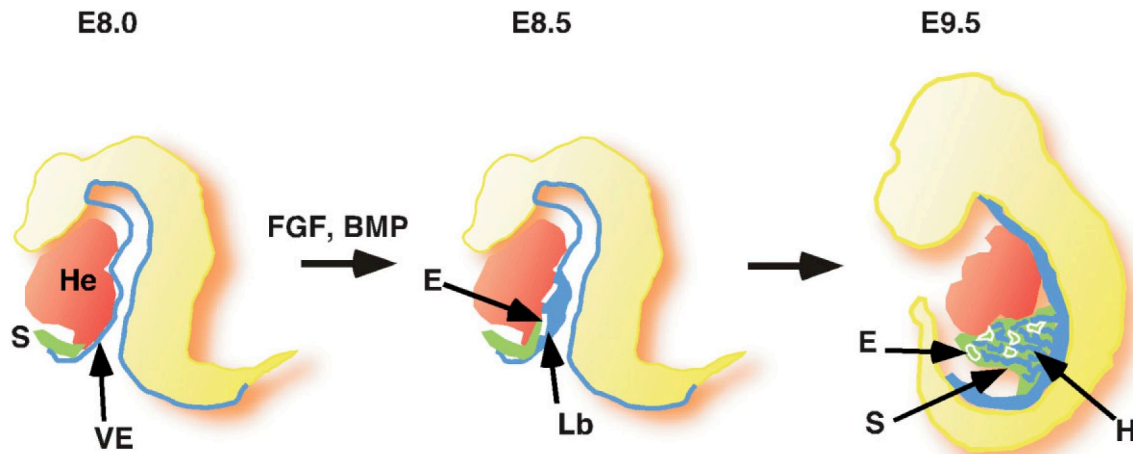
**Pit-Zellen** sind leberspezifische natürliche Killerzellen (Wisse et al. 1976, Nakatani et al. 2004) und gehören zu der Gruppe der intra-hepatischen Leukozyten, auf deren Funktionen im Folgenden nicht weiter eingegangen wird.

**Sinusendothelzellen** haben neben ihre Funktion als Barriere für Blutzellen und Partikel im sinusoidalen Blutstrom weitere wichtige Funktionen. Sie verfügen über hohe pinozytotische und endozytotische Kapazität (Entfernung nicht-physiologisch modifizierter Serumproteine und N-Acetylglucosamin- und Mannose-terminierter Glycoproteine (Smedsrod et al. 1994, Praaning-van Dalen et al. 1987) und spielen u. a. bei der Modulation der Immunantwort durch Induktion regulatorischer T-Zellen eine wichtige Rolle (Knolle et al. 1999).

**Cholangiozyten** sind epitheliale Zellen, die die Gallengänge bilden. **Oval cells**, gelegen innerhalb des intrahepatische Gallengangsgflechts, stellen möglicherweise einen Leber-residenten Stammzelltyp dar, der bei schweren Leberschädigungen zu Cholangiozyten oder Hepatozyten differenzieren kann (Forbes et al. 2002).

#### 2.1.4 Embryonalentwicklung der Mausleber

Die Entwicklung der Leber ist insbesondere in der Maus intensiv erforscht worden (Gualdi et al. 1996, Zhang et al. 2004, Deutsch et al. 2001) und viele Faktoren, die zur Spezifikation des definitiven Endoderms und zur Bildung der daraus entstehenden Leberknospe führen, sind bekannt (Duncan 2000, Kinoshita & Miyajima 2002, Wells & Melton 2000). Am Tag 7.0 der Embryonalentwicklung (E7.0) wird das extraembryonale Endoderm (viscerales Endoderm) des Dottersacks durch das definitive Endoderm, das aus dem Primitivstreifen hervortritt, verdrängt. Im definitiven Endoderm werden zu diesem Zeitpunkt u. a. die Transkriptionsfaktoren *hnf4a*, *hnf3b* (*foxa2*) und *gata4/6* exprimiert. Kurz darauf beginnt die Invagination des Endoderms, die zur Bildung des Vorderdarms führt (Abb. 3). Am Tag 8.0 kommt die ventrale Wand des Vorderdarm-Endoderms in Kontakt zur Herzanlage, wodurch die hepatische Spezifikation u. a. durch FGF1, 2 und 8 (sekretiert vom Herzmesoderm) sowie BMP 2 und 4 (sekretiert vom Septum Transversum Mesenchym) initiiert wird (Jung et al. 1999, Duncan 2000, Zaret 2001, Zhao & Duncan 2005).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Leber-Entwicklung im Maus-Embryo nach Zhao & Duncan, 2005.** E8.0: Ventraler Teil des definitiven Endoderms (blau) in enger Nachbarschaft zur Herzanlage (rot) und dem Mesenchym das zum Septum transversum beitragen wird (grün). Spezifikation des hepatischen Schicksals. E8.5: Das spezifizierte Endoderm bildet die Leberknospe (blau), umgeben von endothelialen Zellen (weiß). E9.5: Hepatoblasten wandern in das Septum transversum Mesenchym ein, aus dem hepatische Sternzellen (HSC) und Sinusendothelzellen (SEC) hervorgehen. He: Herz, S: Septum transversum, VE: ventrales Endoderm, FGF: *fibroblast growth factor*, BMP: *bone morphogenetic protein*, E: Endothelzellen, Lb: Leberknospe, H: Hepatoblasten

Ab Tag 9.5 beginnen endodermale bipotente Vorläuferzellen der Hepatozyten und Cholangiozyten, die Hepatoblasten, zu proliferieren und gemeinsam mit Angioblasten oder Endothelzellen in das Stroma des Septum transversum Mesenchyms einzuwandern. Sie exprimieren neben den Transkriptionsfaktoren *hnf4a*, *hnf3b* (*foxa2*) und *gata4/6* nun auch *hex* und *prox1* und Serumproteine wie AFP und Albumin. Die Hepatoblasten wandern in einer schnurartigen Anordnung in das Septum transversum Mesenchym ein und endotheliale Zellen arrangieren sich mit ihnen zu kapillarähnlichen Strukturen. HGF, OSM, TGF- $\beta$  (als potenter Inhibitor der Hepatozyten-Proliferation (Kamiya et al. 1999)) initiieren im Folgenden die Differenzierung der neonatalen Hepatozyten, deren weitere Differenzierung, Reifung und Polarisierung zusätzlich durch Komponenten der extrazellulären Matrix vorangetrieben wird (Kinoshita & Miyajima 2002).

Cholangiozyten differenzieren in enger Nachbarschaft des Mesenchyms, das die GefäÙanlagen umgibt. Zellen des hepatischen Mesenchyms differenzieren zu einem Zentrum der Blutbildung (Tag E12), lösen damit funktionell den Dottersack ab und gehen der Knochenmark-Hematopoese voraus (Sasse et al. 1992). Hepatische Sternzellen entstammen Zellen des mesenchymalen Septum transversums (Enzan et al. 1997). Gleiches gilt für die sinusoidalen Endothelzellen (Couvelard et al. 1996, Enzan et al. 1997, Matsumoto et al. 2001). Obwohl angenommen wird, dass sich Kupfer-Zellen in adulten Lebern aus Knochenmarks-Monozyten entwickeln, sind sie in fötalen Lebern vor der Bildung des Knochenmarks anzutreffen und entstammen möglicherweise zu diesem Zeitpunkt dem Dottersack (Enzan et al. 1983).

Die Ausbildung der polygonalen Charakteristik des adulten Gewebes ist erst kurz vor der Geburt abgeschlossen (Vassy et al. 1988).

## 2.2 Leber-Fibrose

Leber-Fibrose wird definiert als die abnormale Akkumulation von extrazellulärer Matrix (ECM) in der Leber (Guyot et al. 2006). Die Fibrose wird heutzutage als Modell einer Wundheilungsantwort auf chronische Leberschädigung betrachtet (Albanis & Friedman 2001) und stellt die Reaktion auf Leberschädigungen dar, die durch metabolische Krankheiten, virale Infektionen, Alkohol-Abusus und eine Vielzahl von Chemikalien verursacht werden können (Kmieć 2001). Drei Hauptmechanismen sind für die Pathogenese verantwortlich: Zelltod, abnormale ECM-Ablagerung durch myofibroblastische Zellen (MFB) und vaskuläre Reorganisation. Der Endpunkt der Fibrose ist die Zirrhose und ist verantwortlich für signifikante Krankheits- und Todesfälle. Die Zirrhose ist charakterisiert durch die Bildung regenerativer Knötchen (*nodules*) von Leberparenchym, die durch fibrotische Septen voneinander getrennt werden (Guyot et al. 2006). Die Folgen der Septenbildung sind portovenöser und arteriovenöser Blutstau, und eine effektive Umgehung des aktiven Leberparenchyms. Dies führt u. a. zu vaskulärer Thrombose in den kleineren Gefäßen und weiterem Absterben des funktionellen Parenchyms (Wanless 2002) und Folgekomplikationen wie Ikterus (Gelbsucht) und mangelhafte Blutentgiftung. Während die Fibrose reversibel ist, ist die Zirrhose irreversibel (Bioulac-Sage et al. 2000, Benyon & Iredale 2000). Daher ist die Prävention des Fortschreitens der Fibrose ein Hauptziel der klinischen Forschung.

Die Entstehung der Leber-Fibrose ist durch ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen innerhalb der Leber gekennzeichnet (Kmieć 2001). Die Schädigung von Hepatozyten führt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die zur Aktivierung von Kupffer-Zellen führen, die ihrerseits mit der Ausschüttung von ROS und Zytokinen reagieren (Casini et al. 1997, Gressner 1998, Arthur 2000), die wiederum zur „Aktivierung“ von HSC führen. HSC verlieren dabei ihre Vitamin-A-haltigen Lipidtröpfchen, proliferieren, nehmen eine myofibroblastische Morphologie an, exprimieren *smooth muscle alpha-actin* und beginnen mit exzessiver Produktion von ECM-Komponenten, insbesondere fibrillären Kollagenen (Gressner et al. 2002, Gressner 1998). Weitere Quellen für myofibroblastische Zellen während akuter und chronischer Entzündung der Leber neben den HSC sind portale Fibroblasten, aus der Umgebung der Gefäße der Portalfelder (Kinnman et al. 2003, Tuchweber et al. 1996) und sogenannte *second layer cells*, die in der Umgebung der Zentralvene der *lobules* und in der die Leber umgebenden Glisson-Kapsel vorkommen (Bhunchet & Wake 1992, Guyot et al. 2006). Die relative Beteiligung der einzelnen Subpopulationen unterscheidet sich je nach Auslöser der Leberschädigung und ist

Gegenstand intensiver Forschung. HSC spielen bei der Pathogenese Alkohol- und viralinduzierter und durch metabolische Syndrome oder Cholestasis (durch Gallengangsobstruktion) ausgelösten Fibrosen eine entscheidende Rolle (Bataller & Brenner 2005). Auch bei durch CCl<sub>4</sub>-Schädigung - durch dabei entstehende toxische Metabolite - induzierten Fibrosen werden HSC als die Haupteffektorzellen angesehen (Reeves & Friedman 2002). Portale Fibroblasten sind u. a. in frühen Phasen der portalen Fibrose, verursacht durch Gallengangligatur, von Bedeutung (Kinnman & Housset 2002, Tuchweber et al. 1996).

### **2.3 *in-vitro*-Leber-Toxizitäts-Assays zur Identifizierung leberschädigender Substanzen**

Hepatozyten stellen das Hauptangriffsziel für lebertoxische Substanzen dar. Ihre Schädigung ist der Ausgangspunkt für die Entstehung fibrogener Lebererkrankungen. Daher wird der Einfluss von Medikamenten und anderer Substanzen auf Hepatozyten mit Hilfe von *in-vitro*-Toxizitäts-Assays untersucht. Manche Xenobiotika werden in der Leber erst durch Hepatozyten in hochreaktive Metaboliten biotransformiert, die oft toxischer sind als ihre Ursprungsverbindung. Die Balance zwischen Bioaktivierung und Detoxifikation einer Substanz durch Hepatozyten entscheidet, ob ein reaktives Metabolit einen toxischen Effekt verursacht (Gómez-Lechón et al. 2001).

Tierversuche, die für die Medikamenten-Zulassung nötig sind, sind zeitaufwendig, teuer und oft belastend für die Versuchstiere. Toxikologische *screenings* von Substanzen früh in der Medikamentenentwicklung mit *in-vitro*-Testsystemen sind daher von großer Bedeutung. Primäre Hepatozyten könnten dazu eingesetzt werden (Schleger et al. 2001). Die Benutzung humaner Hepatozyten für therapeutische Anwendungen und die Medikamenten-Entwicklung wird jedoch durch die begrenzte Verfügbarkeit von gesundem menschlichem Lebergewebe, die Unfähigkeit von Hepatozyten in Kultur zu proliferieren und ihre Funktionalität über einen langen Zeitraum beizubehalten, erschwert (Nowak et al. 2005, Rambhatla et al. 2003). Einfache Zytotoxizitäts-Assays mit HepG2-Zellen (humane Hepatokarzinoma-Zelllinie) haben eine schlechte Prädiktivität für humantoxische Substanzen. Der Einsatz von metabolisch kompetenten Zellen ist eine unerlässliche Voraussetzung (Xu et al. 2004). Immortalisierte murine Hepatozyten verfügen über viele Eigenschaften primärer Hepatozyten (Besaratinia & Pfeifer 2005) und stellen eine mögliche Alternative dar. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Nutzung *in-vitro*-differenzierter Hepatozyten aus Vorläuferzellen oder embryonalen Stammzellen (ES-Zellen), die quasi eine unerschöpfliche Quelle für funktionelle Hepatozyten für präklinische pharmakologische Studien darstellen (Snykers et al. 2006). Dabei ist langfristig die Verwendung humaner ES-Zellen, insbesondere in Bezug auf die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse, anzustreben. Die Verwendung von murinen

ES-Zellen stellt gewissermaßen eine Zwischenstufe der Entwicklung dar, unter anderem aufgrund des durch die Gesetzeslage limitierten Zugriffs auf humane ES-Zellen. Das murine System hat zudem entscheidende Vorteile. Die etablierten gentechnischen Methoden erlauben die Herstellung transgener Linien, die für die Optimierung der *in-vitro*-Differenzierungs- und Toxizitäts-Assays, aber auch für die Grundlagenforschung, entscheidende Erkenntnisse liefern können.

## 2.4 *in-vitro*-Differenzierung (IVD) von embryonalen Stammzellen zu Hepatozyten

Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) sind pluripotent, d.h. sie sind in der Lage, Zellen aller drei embryonalen Keimblätter und Keimbahnzellen hervorzubringen. Als definitiver Beweis der Pluripotenz gilt die Injektion von ES-Zellen in Blastozysten zur Generierung chimärer Mäuse, deren Nachkommen das Genom der ES-Zellen tragen (Rossant & Joyner 1989, Capecchi 1989). Auch *in vitro* gelang es aus humanen und murinen ES-Zellen, Zellen aller drei Keimblätter zu generieren (Odorico et al. 2001, Reubinoff et al. 2000, Thomson et al. 1998). Allerdings muss festgestellt werden, dass die *in-vitro*-Differenzierung heterogene Zellpopulationen hervorbringt deren Definition zelltypspezifische Marker erfordert. Dabei müssen insbesondere zur Identifikation hepatischer Zellen, Marker gewählt werden, die nicht auch im Dottersack oder Pankreas exprimiert werden, da in diesen Geweben eine gewisse Überlappung bezüglich der Genexpression bestehen. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Differenzierung ein gradueller Prozess ist und in verschiedenen Entwicklungsphasen unterschiedliche Marker exprimiert werden (Lavon & Benvenisty 2005). Daher werden in der Literatur im Zusammenhang mit *in-vitro*-differenzierten Hepatozyten oftmals die Begriffe *hepatic like* bzw. *hepatocyte like cells* (hepatozytenartige Zellen) verwendet, da streng genommen nur solche Zellen als Hepatozyten bezeichnet werden dürfen, deren Funktionalität in Tiermodellen *in vivo* nachgewiesen ist.

Es existiert eine Vielzahl von Protokollen, um ES-Zellen in hepatozytenartige Zellen zu differenzieren, wobei man die spontane von der gerichteten Differenzierung unterscheiden kann. Spontane Differenzierung wird initiiert, wenn ES-Zellen ohne den für die Pluripotenzerhaltung essentiellen *leukemia inhibitory factor* (LIF) in Suspensionskultur wachsen (Abe et al. 1996, Chinzei et al. 2002, Jones et al. 2002, Miyashita et al. 2002, Yamada et al. 2002, Asahina et al. 2004, Kumashiro et al. 2005b) und so genannte *embryoid bodies* (EBs) bilden, ein Begriff, der aus der Beschreibung von Teratokarzinomen abgeleitet wurde (Martin & Evans 1975). Bei der gerichteten Differenzierung werden die Zellen in Richtung der endodermalen Linie dirigiert, indem verschiedene Wachstumsfaktoren eingesetzt und die EBs nach mehrtägiger Suspensionskultur auf eine adhärenente kollagen-

haltige Matrix ausgesät werden (Hamazaki & Terada 2003, Hu et al. 2004, Kuai et al. 2003), um die kollagenhaltige Matrix des Transversum-Mesenchyms während der Auswanderung der Hepatoblasten während der Embryogenese zu simulieren. Kubo et al. (2004) reichten endodermale Zellen gezielt durch limitierte Serumexposition der EBs an. Als Wachstumsfaktoren kamen oftmals die ebenfalls während der Embryonalentwicklung bedeutenden *fibroblast growth factor* (aFGF), *hepatocyte growth factor* (HGF), Oncostatin M (OSM) und chemische Faktoren wie Dexamethason zum Einsatz (Lavon & Benvenisty 2005):

- **aFGF** wird vom Herzmesoderm sekretiert und ist einer der ersten Faktoren (gemeinsam mit bFGF), der das Vorderdarm-Endoderm spezifiziert
- **HGF** unterstützt fetale Hepatozyten während der mittleren Phase der Hepatogenese
- **OSM** wird von hematopoetischen Zellen produziert und induziert die Differenzierung von fötalen Hepatozyten (Kamiya et al. 1999)
- **Dexamethason** ist ein synthetisches Glucocorticoid-Hormon und aktiviert die Induktion Gluconeogenese-assoziiierter Enzyme in der Leber wie der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (*pepck1*) (Michalopoulos et al. 2003)

Als weitere Variante zur gerichteten Differenzierung wurden genetisch veränderte (transgene) Zelllinien eingesetzt. Kanda (2003), Levinson-Dushnik (1997) und Ishizaka (2002) verwendeten eine *hnf3b*-Transgene (*foxa2*) ES-Zelllinie. *hnf3b* ist für die Expression einer Vielzahl hepatischer Gene essentiell (Duncan et al. 1998).

Zur Charakterisierung der *in-vitro*-Differenzierungskulturen wurden stets RT-PCR-Analysen zum Nachweis endodermaler bzw. hepatozytenassoziiierter Transkripte durchgeführt. Dabei wurden u. a. die Transkripte für die Transkriptionsfaktoren TCF1, TCF2, HNF3A (*foxa1*), HNF3B (*FOXA2*), HNF4A, HNF6 und der Proteine A1AT, AFP, TTR und Albumin, der Enzyme Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO), TAT, Cytochrom P450 Enzyme (CYP) und PEPC1 untersucht. Die Spezifität der verschiedenen Transkripte ist für die Beurteilung des Differenzierungsgrades von entscheidender Bedeutung: AFP, TTR und HNF3B (*FOXA2*) werden sowohl im Dottersack als auch im Lebergewebe exprimiert, AFP dabei nur in embryonalen Hepatozyten, TTR in fast allen Stadien der Entwicklung. HNF4A, TAT und PEPC1 werden zusätzlich auch in mesodermalen Geweben exprimiert. Albumin gehört zu einem der frühesten Lebermarkern und wird bereits nach der Spezifikation des hepatischen Endoderms exprimiert. Die *albumin*-RNA-Expression ist auf die sich entwickelnden Hepatoblasten begrenzt und ist eine der wenigen RNAs, die nicht im Darm oder anderen endodermalen Organen innerhalb des Embryos detektierbar (Cascio & Zaret 1991) und ebenso kennzeichnend für adulte Hepatozyten ist. Cyp7A1 wird in der Leber und nicht im Dottersack exprimiert und gilt daher als spezifischer Marker für Hepatozyten.



Zur genauen Charakterisierung von einzelnen Zellpopulationen sind hochreine Kulturen von Nöten. *in-vitro*-Differenzierung führt trotz aller Versuche zur gerichteten Differenzierung zu Mischkulturen. Um insbesondere biochemische Analysen mit Zellen eines bestimmten Typs durchführen zu können, müssen Reinkulturen produziert werden. Um spezifische Populationen von Zellen zu isolieren, werden Zellen in der Regel anhand von Oberflächenmarkern markiert und isoliert. Hepatozyten verfügen leider über keinen solch spezifisch exprimierten Marker und sollten daher genetisch manipuliert werden um eine Sortierung aus heterogenen Populationen zu erlauben (Lavon & Benvenisty 2005).

## 2.5 Die Bedeutung von TGF- $\beta$ für die Aktivierung von HSC

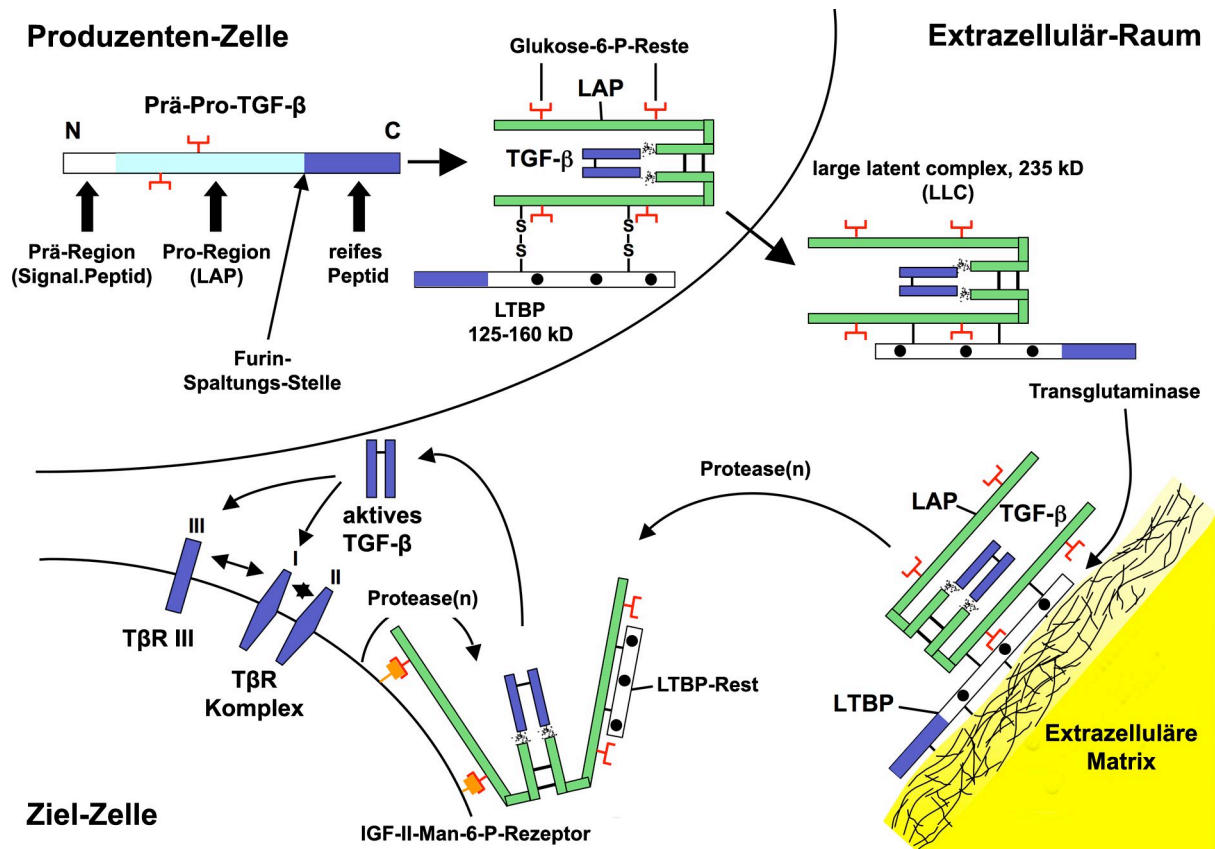
Verschiedene Zytokine sind bei der Pathogenese der Leber-Fibrose von entscheidender Bedeutung: *platelet derived growth factor*, PDGF und *epidermal growth factor*, EGF stehen in Verbindung mit der gesteigerten Proliferation aktivierter HSC (Kmieć 2001, Gressner & Weiskirchen 2006). Durch Einsatz dominant-negativer löslicher PDGF-Rezeptoren konnte der Grad der Fibrose, ausgelöst durch eine Gallengangsligatur, deutlich reduziert werden (Borkham-Kamphorst et al. 2004a). TNF-alpha (Bachem et al. 1993, Knittel et al. 1997), IL-1 (Armendariz-Borunda et al. 1992), IL-6 (Greenwel et al. 1995) und TGF- $\beta$ 1 (Bachem et al. 1993) sind an der Aktivierung der HSC zu Myofibroblasten beteiligt.

Der wichtigste fibrogene Mediator in der Leber ist der *transforming growth factor beta 1*, TGF- $\beta$ 1 (Kmieć 2001). TGF- $\beta$  fördert die Transition von HSC zu MFB-ähnlichen Zellen, stimuliert die Synthese und inhibiert die Degradierung von ECM-Proteinen (Bachem et al. 1993). Strategien zur Verhinderung der TGF- $\beta$ 1 Synthese und oder des Signaltransduktionsweges führten zu deutlicher Reduktion der Fibrose in experimentellen Modellen (Shek & Benyon 2004), Studien mit transgenen Mäusen zeigten, dass eine chronische Produktion von aktivem TGF- $\beta$ 1 starke hepatische und renale Fibrose verursacht und mit verstärkter Kollagen-Deposition und Hepatozyten-Nekrose einhergeht (Sanderson et al. 1995). TGF- $\beta$ 1-KO-Mäuse zeigten nach CCl<sub>4</sub>-Schädigung deutlich reduzierte Kollagen-Depositionen in der Leber und legten eine Rolle von TGF- $\beta$ 1 bei der Aufrechterhaltung der HSC-Aktivierung nahe (Hellerbrand et al. 1999).

Parakrine und autokrine Mechanismen spielen für die TGF- $\beta$ 1-vermittelte HSC-Aktivierung eine Rolle. Kupffer-Zellen und Endothelzellen entlassen in Reaktion auf hepatische Schädigung TGF- $\beta$ 1, aktivieren dadurch die HSC, die ihrerseits durch Produktion von TGF- $\beta$ 1 eine autokrine Stimulation etablieren und die Transdifferenzierung weiter antreiben und aufrechterhalten (Gressner 1998).

## 2.6 LTBP1: Kontrolle der TGF- $\beta$ Bioverfügbarkeit

In Säugetieren existieren drei Isoformen des TGF- $\beta$  (TGF- $\beta$ 1, -2, -3). Diese werden in Form hochmolekularer Komplexe als inaktive (latente) Vorläufer-Proteine sezerniert. Das reife TGF- $\beta$  Dimer ist dabei nicht-kovalent mit dem abgespaltenen N-terminalen Teil (*latency associated Protein*, LAP) des ursprünglichen Propeptids verbunden (Olofsson et al. 1992, Munger et al. 1997). Dieser *small latency complex* (SLC) ist über Disulfidbrücken an das glykosilierte *latent-TGF- $\beta$ -binding protein* (LTBP) gebunden und bildet den *large latency complex* (LLC) (Hyytiäinen et al. 2004). Vier verschiedene *ltbp*-Isoformen wurden isoliert (Giltay et al. 1997, Morén et al. 1994, Yin et al. 1995, Miyazono et al. 1991). Drei der Isoformen können mehr oder weniger effektiv mit TGF- $\beta$ 1 interagieren (Saharinen & Keski-Oja 2000). LTBP1 gehören zu der Fibrillin-Superfamilie, einer Gruppe von Matrixproteinen mit hohem Molekulargewicht, die über mehrere *epidermal growth factor like* (EGF-like) und charakteristische 8-Cystein-Motive verfügen (Saharinen et al. 1999, Oklü & Hesketh 2000). Die EGF-Motive vermitteln die Bindung zu anderen Proteinen, die N-terminale *hinge*-Region und Teile der C-terminalen Regionen sind für die Wechselwirkung mit der ECM verantwortlich (Unsöld et al. 2001, Taipale et al. 1994, Sinha et al. 1998, Olofsson et al. 1995). Die kovalente Bindung an den TGF- $\beta$ 1-SLC erfolgt über das dritte der 8-Cystein-Motive (Saharinen & Keski-Oja 2000, Lack et al. 2003, Chen et al. 2005). Durch diese Bindemotive wird das prozessierte TGF- $\beta$  in seiner latenten Form (SLC) im *trans*-Golgi gebunden und nach dem Export aus der Zelle in der ECM lokalisiert (Abb. 4) und liegt dort dann in der LTBP1 assoziierten Form als inaktiver *large latency complex* (LLC) vor (Taipale et al. 1994). Der genaue Mechanismus der TGF- $\beta$  Aktivierung ist nicht vollständig geklärt, scheint aber *in vitro* Studien nach durch Plasminogen und andere Proteasen kontrolliert zu werden (Sato et al. 1990, Lyons et al. 1988, Gressner et al. 2005). LTBP1 spielt somit eine Rolle bei der Sekretion und der Regulation der Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$ . In viele Zelltypen scheint LTBP1 für die normale Reifung und Sekretion von TGF- $\beta$  unerlässlich (Miyazono et al. 1991). Andere Zellen scheinen auch ohne LTBP-Expression SLCs sekretieren zu können (Dallas et al. 1994). Nach Freisetzung aus den Latenzvermittelnden Komplexen initiiert TGF- $\beta$  schließlich die Assoziation und Phosphorylierung von Rezeptoren und schließlich von Smad Transkriptionsfaktoren, die eine Transkription von Zielgenen auslösen (Massagué 2000, Shi & Massagué 2003).



**Abb. 4: Schematische Darstellung der LTBP-abhängigen Sekretion von TGF-β nach Gressner et al. (2005).** Nach Prozessierung zum SLC (TGF-β + LAP) wird dieser Komplex an LTPB1 konjugiert und als *large latency complex* (LLC) sekretiert. Die Transglutaminase katalysiert die kovalente ECM-Verknüpfung des LLC. Durch Protease-Wirkung wird aktives TGF-β aus dem LLC freigesetzt, der von den Zielzellen über Glukose-6-P-Reste gebunden wird. Die TGF-β-Signaltransduktion verläuft über zwei alternative Signalwege an denen verschiedenen Rezeptoren beteiligt sind. LAP: *latency associated peptide*.

## 2.7 *in-vitro*-Transdifferenzierung von HSC

Die Erkenntnisse über die Rolle der HSC während der Fibrogenese beruhen zum Teil auf der Tatsache, dass sie aus der Leber isoliert werden können, und dass HSC und oder MFB-artige Zellen *in vitro* kultiviert werden können (Friedman 1999, Knook et al. 1982, Otto & Veech 1980). Es wird allgemein anerkannt, dass HSC, die auf Plastik kultiviert werden, Veränderungen durchlaufen, die den Prozess der Transdifferenzierung oder Aktivierung rekapitulieren, der *in vivo* stattfindet. Das Resultat sind homogene Kulturen MFB-artiger Zellen, die einfach subkultiviert und analysiert werden können (Friedman 1999, Friedman 1993, Gressner 1994). Der aktivierte Phänotyp wird nach fünf bis siebentägiger Kultivierung erreicht und ist gekennzeichnet durch betonte synthetische, proliferative, chemotaktische und kontraktile Aktivität (Friedman et al. 1993, Gressner 1998).

Der Begriff der Transdifferenzierung hat sich in der Literatur etabliert, obwohl es sich bei dem Prozess nicht entsprechend der entwicklungsbiologischen Definition um eine Differenzierung in einen Zelltyp eines anderen embryonalen Keimblattes handelt, da sowohl HSC, als auch MFB dem mesodermalen Keimblatt entstammen. Obwohl es auf der Hand liegt, dass *in vitro* Bedingungen nicht exakt die Situation in der fibrogenen Leber abbilden können, hat sich das Modell als hilfreich in der Analyse der Transdifferenzierung erwiesen (Borkham-Kamphorst et al. 2004b). In einer Proteom-Analyse von Ratten HSC waren 60% der Proteine während der Aktivierung *in vitro* und *in vivo* übereinstimmend reguliert (Kristensen et al. 2000). Microarray-Analysen *in-vitro*-kultivierter HSC lieferten Erkenntnisse über transdifferenzierungsrelevante Gene (Liu et al. 2004, Schnabl et al. 2005b, Schnabl et al. 2005a). Die Isolierung von HSC beruht u. a. auf ihrer geringen Dichte (aufgrund des hohen Lipidgehalts) und ermöglicht die Präparation sehr reiner Zellpopulationen (Knook et al. 1982). Aktivierte HSC lassen sich dagegen nicht ohne weiteres aus fibrotischen Lebern selektiv isolieren. Dieser Aspekt erklärt zudem die Attraktivität der *in-vitro*-Aktivierung und -Analyse.

### 3 Zielsetzung

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden zwei Projekte im Themenkomplex Leber-Fibrose bearbeitet. In dem ersten Projektteil sollten Hepatozyten aus ES-Zellen *in-vitro*-differenziert werden und mit Hilfe eines transgenen Oberflächenmarkers selektioniert werden, um sie in reiner Form in Lebertoxizitätstest einzusetzen, die zur Identifizierung leberschädigender Substanzen dienen können. In dem zweiten Projektteil sollte die Rolle des LTBP1, das die Sekretion und Bioverfügbarkeit des Zytokins TGF- $\beta$ 1 kontrolliert, bei der „Aktivierung“ von HSC *in vitro* und *in vivo* analysiert werden. HSC, die in Reaktion auf Leberschädigungen von ihrem ruhenden in einen aktivierten Zustand übergehen, gelten als die Hauptverursacher der abnormalen Umstrukturierung der extrazellulären Matrix während der Pathogenese der Leber-Fibrose.

Projekt 1: Herstellung von Hepatozyten-Reinkulturen aus *in-vitro*-differenzierten ES-Zellen zur Etablierung eines Leber-Toxizitäts-Assays.

Zur Isolierung von Hepatozyten-Vorläuferzellen aus *in-vitro*-Differenzierungskulturen sollten zunächst ES-Zellen generiert werden, die nach Differenzierung zu hepatozytenartigen Zellen einen transgenen Oberflächenmarker unter Kontrolle eines hepatozytenspezifischen Promotors exprimieren. Alternativ zu der heterologen transgenen Strategie sollten ES-Zellen durch homologe Rekombination manipuliert werden. Das eingebrachte Markergen sollte dadurch unter der natürlichen Transkriptionskontrolle eines Genlocus in den Zielzellen exprimiert werden. Zur parallelen visuellen Identifizierung hepatozytenartiger Zellen sollte ein extrazelluläres, transmembranäres EGFP-Fusionsprotein (*enhanced green fluorescent protein*) als Oberflächenmarker etabliert werden und die Spezifität der Expression *in vitro*, durch Differenzierungsstudien von ES-Zellen sowie *in vivo*, durch ein transgenes Tiermodell nachgewiesen werden.

Projekt 2: Analysen zur Rolle des *Itbp1*-Gens bei der Aktivierung von HSC *in vitro* und *in vivo*.

Das LTBP1-Protein ist bei der Kontrolle der TGF- $\beta$ 1 Bioverfügbarkeit in unterschiedlichen Zelltypen von Bedeutung. Bei der Aktivierung von HSC zu MFB ist TGF- $\beta$ 1 ein entscheidender Induktor. Zur Klärung der Relevanz des LTPB1 bei der Aktivierung von HSC sollte das Transdifferenzierungspotential *Itbp1*-defizienter HSC *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Als Grundlage dazu sollte eine *Itbp1 knock out* Maus dienen, die im Rahmen der Arbeit zudem näher charakterisiert werden sollte.

## 4 Ergebnisse

### A Erstellung eines Modells zur Analyse lebertoxischer Substanzen

#### 4.1 Herstellung einer transgenen ES-Zelllinie mit konstitutiver, transmembranärer EGFP-Expression

Die MACS-Sortierung (magnetic cell sorting) von *in-vitro*-differenzierten Hepatozyten setzt voraus, dass ein exklusives Epitop auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert wird. Um dies zu Erreichen, bietet sich die Möglichkeit, ein transmembranär zu exprimierendes Transgen unter der Kontrolle eines hepatozytenspezifischen Promotors in ES-Zellen einzubringen. Die Wahl des *enhanced green fluorescing protein* (EGFP) als Transgen erlaubt die gleichzeitige Identifizierung der Zielzellen mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie.

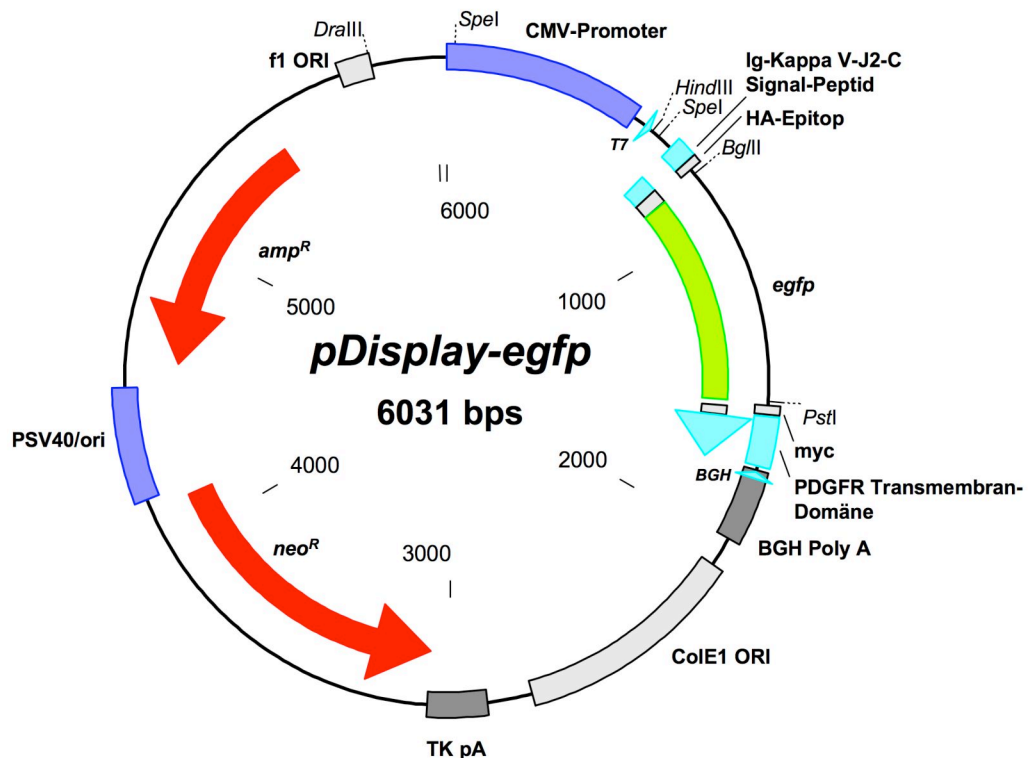
Zur Überprüfung der Funktionalität des EGFP-Fusionsproteins als Reporter gen und Oberflächenepitop in embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) sollten stabile transgene ES-Zelllinien generiert werden. Eine Transfektion mit dem Expressionsvektor *pDisplay-egfp*, der eine CMV-Promotor-abhängige Transgenexpression ermöglicht, lieferte ES-Zellklone, die konstitutiv das EGFP-Fusionsprotein exprimierten.

##### 4.1.1 Klonierung des Expressionsvektors *pDisplay-egfp*

Der Expressionsvektor *pDisplay* (Invitrogen) erlaubt die Präsentation von Proteinen auf der Zelloberfläche eukaryontischen Zellen. In *pDisplay* eingebrachte Transgene werden am N-Terminus an die Signalpeptid-Sequenz der murinen Ig-kappa-Leichte-Kette fusioniert, die den Export des Proteins über den sekretorischen Transportweg bewirkt. Am C-Terminus des Fusionsproteins befindet sich die Transmembrandomäne des *platelet derived growth factor receptor* (PDGFR), der das Fusionsprotein in der Plasmamembran verankert und die extrazelluläre Präsentation des Transgens bewirkt. Die Expression erfolgt unter Kontrolle des CMV-Promotors.

Zur extrazellulären Präsentation von EGFP wurde die 717 bp umfassende kodierende Sequenz des *egfp*-Gens (ohne Stop-Codon) in *pDisplay* kloniert (*pDisplay-egfp*, Abb. 5). Als Matrize für die PCR-Amplifikation des *egfp* diente der Vektor PL61. Die verwendeten *primer* enthielten jeweils im 5'-Bereich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bgl*II und *Pst*I, die, nach Sequenzverifizierung des PCR-Amplifikats, eine gerichtete Klonierung in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Zielvektors *pDisplay* erlaubten. Rekombinante Plasmide wurden durch Restriktionsanalyse identifiziert. Die Sequenzierung bewies im

Folgendes, dass das *egfp*-Gen korrekt im Leserahmen des Expressionsvektors integriert ist und die erwartete Basensequenz aufweist.



**Abb. 5: Expressionsvektor *pDisplay-egfp*.** BGH: BGH-Sequenzierprimer, HA: Hämagglutinin; TK pA: Thymidinkinase-Polyadenylierungssignal; T7: T7-Sequenzierprimer; ORI: Replikationsursprung

#### 4.1.2 Herstellung transgener muriner *pDisplay-egfp*-ES-Zellen

Das erstellte Konstrukt *pDisplay-egfp* verfügt mit dem CMV-Promotor über einen starken Promotor, der in einer Vielzahl von ES-Zelllinien zur Expression von Transgenen verwendet wurde (Ward & Stern 2002). Daher konnte die Funktionalität des auf *pDisplay-egfp* kodierten EGFP-Fusionsproteins in der R1-ES-Zelllinie überprüft werden. Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation. Hierbei werden die Zellmembranen exponentiell wachsender Empfängerzellen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht. Zur Selektion resistenter, transgener ES-Zellklone wurde G418 verwendet. Nach zehntägiger Selektion wurden 18 resistente Klone expandiert und mittels PCR genotypisiert. 88 % der ES-Klone hatten das *egfp*-Konstrukt stabil in ihr Genom integriert und konnten für funktionelle Analysen verwendet werden.

### 4.1.3 Funktionelle Analyse der EGFP-Expression in stabilen *pDisplay-egfp*-ES-Zell-Transfektanten

Für eine Verwendung des EGFP-Fusionsproteins als extrazelluläres Antigen für Antikörperbasierte Zellseparation mittels MACS war es erforderlich, dass das Protein in ausreichender Stärke exprimiert und effizient und in richtiger Orientierung in der Zellmembran verankert ist.

#### 4.1.3.1 Laser-Scan-Mikroskopie (LSM)

Mittels Laser-Scan-Mikroskopie ist es möglich, die intrazelluläre Lokalisierung von fluoreszenten Proteinen zu analysieren. Dazu wurden R1-ES-Zellklone auf Gelatinebeschichteten Deckgläschen kultiviert und fixiert. Mit Hilfe eines Laser-Scan-Mikroskops wurden anschließend Schichtaufnahmen durchgeführt. Die EGFP-Fluoreszenz war deutlich in zwei subzellulären Strukturen konzentriert. So wiesen einerseits die Zellmembranen deutliche EGFP-Fluoreszenz auf, andererseits ließen sich im Zellzentrum Agglomerationen von EGFP erkennen, die mit großer Wahrscheinlichkeit Strukturen des sekretorischen Proteintransportweges darstellen, der zum Export des Proteins aus dem endoplasmatischen Reticulum dient (Abb. 6 A-C). Somit lieferten die LSM-Aufnahmen Gewissheit über die Funktionalität des EGFP-Fusionsproteins und lassen darüber hinaus deutlich die Lokalisierung in der Zellmembran erkennen.

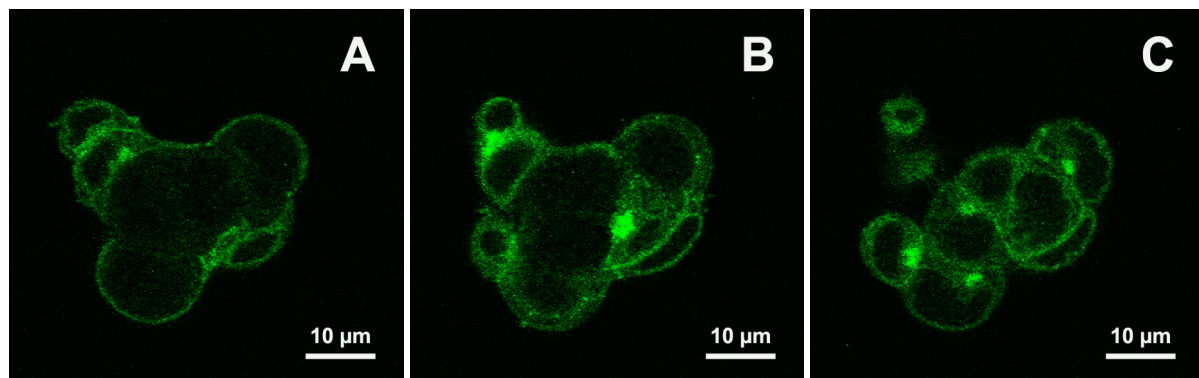


Abb. 6: A-C: LSM-Schichtaufnahmen eines mit *pDisplay-egfp* stabil transfizierten ES-Zellklons im Abstand von jeweils 4 µm.

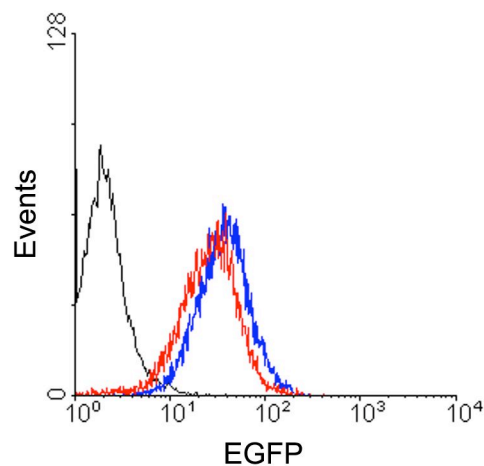


### 4.1.3.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers lassen sich neben den Größen- und Granularitätseigenschaften auch die Fluoreszenzeigenschaften von Einzelzellen untersuchen. Tote Zellen und Zellrümpfer werden dabei aufgrund ihrer optischen Eigenschaften und nach Färbung mit Propidium-Iodid von der Analyse ausgeschlossen.

Durch vergleichende Messungen mit einer Negativkontrolle lassen sich somit Erkenntnisse über die relative Fluoreszenzstärke zweier Proben gewinnen.

Zum Nachweis der EGFP-Expression wurden qualitative Messungen mit einem Durchflusszytometer durchgeführt. Zwei mit *pDisplay-egfp* stabil transfizierte Klone wurden dabei im Vergleich mit WT-Zellen analysiert (Abb. 7). Beide Klone zeigten eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im Wellenlängen-Bereich der EGFP-Emission (FL1-Fotodetektor) bei 514 nm. Außerdem wurde das transgene EGFP von allen Zellen der beiden unabhängigen Klone exprimiert.

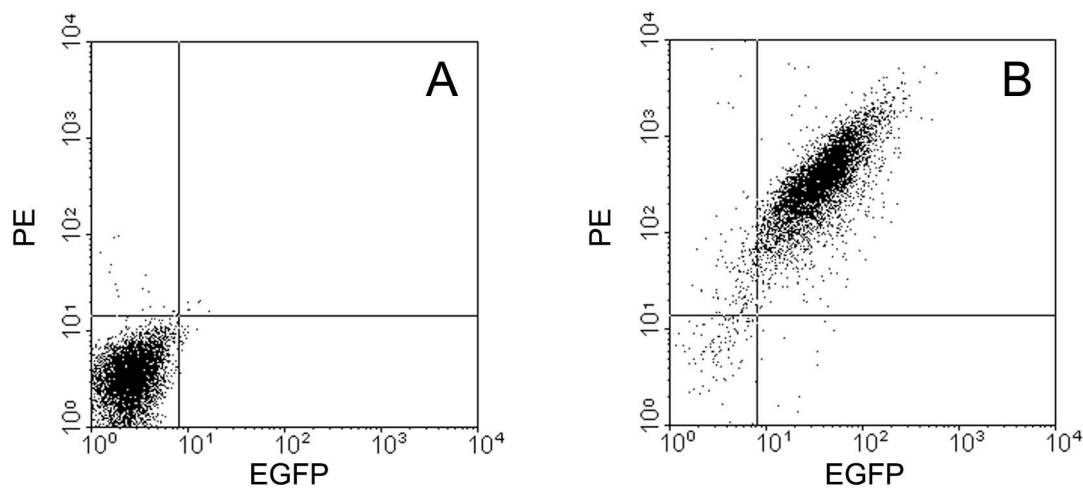


**Abb. 7: Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Fluoreszenz stabil transfizierter *pDisplay-egfp*-R1-ES-Zellklone. WT (schwarz), Klon #1 (blau), Klon #6 (rot).**

#### 4.1.3.3 Nachweis der extrazellulären Präsentation von EGFP

Nachdem die Expression und membranäre Lokalisation (LSM) nachgewiesen worden war, musste im Folgenden überprüft werden, ob das EGFP-Fusionsprotein zudem extrazellulär präsentiert wurde, da nur dies eine spätere MACS-Selektion ermöglichte.

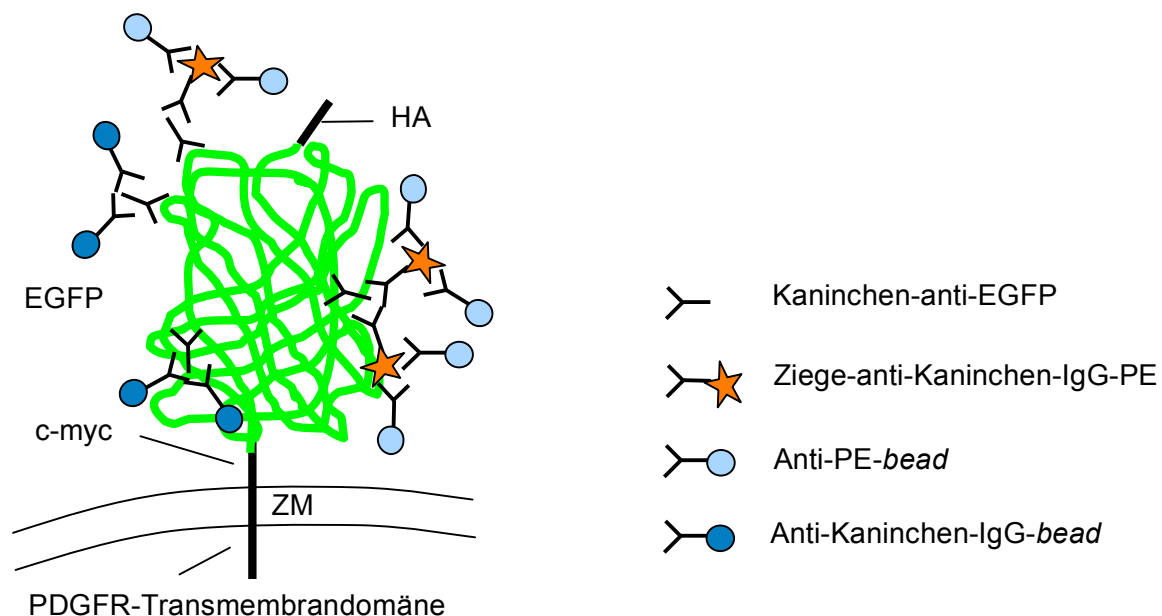
Zum Nachweis der Präsentation auf der Zelloberfläche wurden daher Antikörperfärbungen mit unfixierten, nicht-permeabilisierten Zellen durchgeführt, da auf diese Weise nur Oberflächenepitope angefärbt werden können. Die Färbung wurde mit anti-EGFP-Kaninchen-Serum und einem sekundären Ziege-anti-Kaninchen-Phycoerythrin (PE)-Konjugat an *pDisplay-egfp*-transgenen und WT-ES-Zellklonen durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Durch die indirekte Immun-PE-Markierung zeigten die transgenen Klone neben der deutlichen EGFP-Fluoreszenz zusätzlich eine starke Fluoreszenz im FL-2 Kanal (Detektion bei 578 nm) (Abb. 4B). WT-ES-Zellen wurden durch die Immunmarkierung mit entsprechenden Antikörper-Titern nicht angefärbt (Abb. 8). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass das EGFP-Fusionsprotein auf der extrazellulären Membranseite lokalisiert und zudem für Immunfärbungen sterisch zugänglich ist.



**Abb. 8:** Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Lokalisation eines stabil transfizierten *pDisplay-egfp-R1*-ES-Zellklons (B) und eines WT-Klons (A) als Kontrolle. Durch Immunmarkierung unfixierter Zellen konnte bei *pDisplay-egfp*-transgenen Klonen extrazellulär präsentiertes EGFP nachgewiesen werden (B). Ein Klon ist repräsentativ dargestellt.

#### 4.1.3.4 Magnetische Zell-Sortierung (MACS) von ES-Zellen mit konstitutiver EGFP-Expression

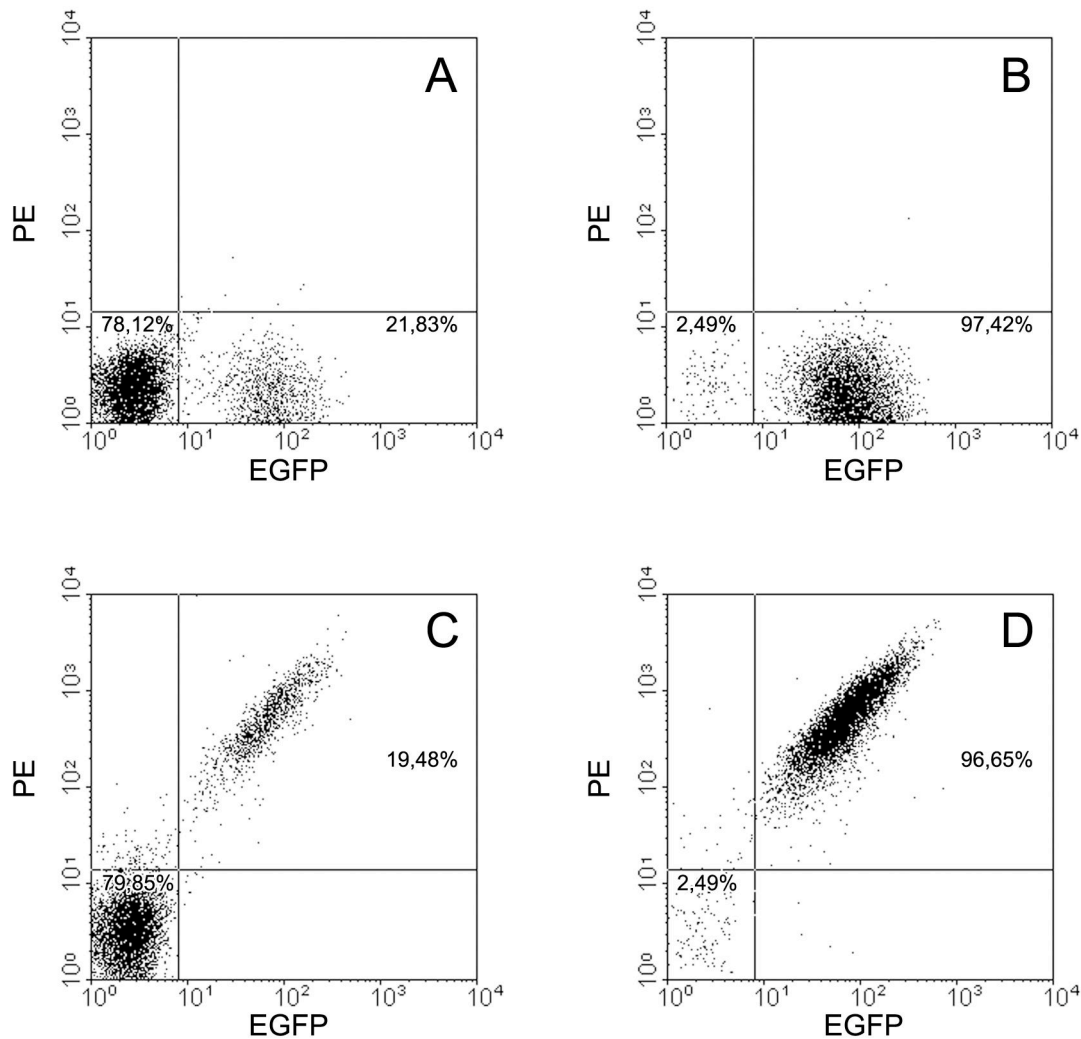
Durch den Nachweis der extrazellulären Lokalisation des EGFP-Fusionsproteins und die Erkenntnis, dass mit anti-EGFP-Serum eine Immunmarkierung von unfixierten, lebenden Zellen möglich war, konnte im Folgenden eine magnetische Zellseparation (MACS) durchgeführt werden. Grundsätzlich wurden zwei MACS-Strategien verfolgt, eine Zweischritt- und eine Dreischritt-Strategie (Abb. 9). Zunächst wurde jeweils mit dem anti-EGFP-Kaninchen-Serum gefärbt. Daraufhin konnte die magnetische Markierung der Zielzellen entweder A) mit anti-Kaninchen-IgG-*beads* oder B) mit einem sekundären Antikörper-PE-Konjugat und einem tertiären anti-PE-*bead* vorgenommen werden (Abb. 9).



**Abb. 9: Schematische Darstellung der MACS-Strategie:** Zellen mit extrazellulär präsentem EGFP-Fusionsprotein (grün/schwarz) können durch Kombination von zwei bzw. drei Antikörpern magnetisch markiert werden. ZM: Zellmembran, PDGFR: *platelet derived growth factor receptor*, c-myc: c-myc-Epitop, HA: Hämagglutinin-Epitop.

Zum qualitativen und quantitativen Vergleich der beiden Strategien wurden konstitutiv EGFP exprimierende R1-ES-Zellen im Verhältnis eins zu vier mit R1-WT-Zellen vermischt und nach den entsprechenden Färbeprotokollen vergleichende MACS-Separationen durchgeführt. Die ca. 20%-ige EGFP-exprimierende Ausgangspopulation konnte in beiden Fällen in einem Separationsschritt auf ca. 97% Reinheit angereichert werden (Abb. 10). Der Anteil an zurückgewonnenen positiven Zellen lag im Falle des Zweischritt-Verfahrens bei 40%, beim Dreischritt-Verfahren bei 22% der ursprünglich eingesetzten Zellen. Somit war die

grundsätzliche Durchführbarkeit für die erdachte Isolierungsstrategie erfüllt. Bei entsprechend starker EGFP-Expression erlaubt eine MACS-Aufreinigungsstrategie die Isolierung hochreiner EGFP-exprimierender Zellen. Selbst bei einem 5%igem Anteil EGFP-positiver Zellen in der Ausgangspopulation konnte eine entsprechende Anreicherung erreicht werden (nicht gezeigt).



**Abb. 10: Aufreinigung EGFP-exprimierender ES-Zellen aus Zellmischungen mit WT-ES-Zellen mittels MACS.** A, B: Zweischritt-Verfahren mit anti-IgG-beads; C, D: Dreischritt-Verfahren mit anti-PE-beads. A, C Zellsuspension vor Separation; B, D: Eluat nach MACS-Separation. Die relativen Zellzahlen der EGFP-negativen und -positiven Zellen sind jeweils angegeben.

#### 4.2 Herstellung einer transgenen ES-Zelllinie mit hepatozytenspezifischer, transmembranärer EGFP-Expression

Im Rahmen der *in-vitro*-Differenzierung sollte EGFP in seiner Funktion als Reporter zur visuellen Identifikation und als spezifisches Antigen für die Isolierung der Zielzellen genutzt werden. Daher wurde angestrebt, dass ausschließlich differenzierte Hepatozyten oder deren

Vorläuferzellen eine spezifische und starke EGFP-Expression aufweisen sollten. Um dies zu erreichen, musste für die Steuerung der EGFP-Expression ein starker hepatozytenspezifischer Promotor eingesetzt werden. Verschiedene Promotoren wurden aufgrund ihrer in der Literatur beschriebenen Expressionsspezifität während der Organogenese der Leber im Mausembryo und aufgrund von Erfahrungen in transgenen Modellen in Betracht gezogen, darunter der *transthyretin*-Promotor (*ttr*), der humane *alpha-1-antitrypsin*-Promotor (*a1at*) und der *albumin*-Promotor (*alb1*, *alb*).

Als weitere Quelle wurde der *Gene Expression Atlas* des *GNF* (*Genomic Institute of the Novartis Research Foundation*), der die Expressionsdaten von 45 Mausgeweben, -organen und -zelllinien bereitstellt und auf Affimetrix-Microarray-Analysen basiert, hinzugezogen (Su et al. 2002).

Die Syntheseprodukte der Gene *ttr*, *a1at* und *alb* sind allesamt sezernierte Proteine und charakteristische Produkte von Hepatozyten. *ttr*, auch Präalbumin genannt, wurde zur hepatozytenspezifischen Transgenexpression eingesetzt (Tosh et al. 2002, Tannour-Louet et al. 2002), wird aber neben der Leber zusätzlich in fast allen untersuchten Mausgeweben exprimiert (Abb. 11 A) und schied deshalb als spezifischer Promotor aus.

In der Maus existieren fünf Varianten des *a1at*-Gens, genannt *serpina1a* bis *serpina1e* bzw. *spi1-1* bis *spi1-5* (Forsyth et al. 2003). Der humane *a1at*-Promotor wurde in der Maus zur hepatozytenspezifischen Transgenexpression verwendet (Yull et al. 1995, Gay et al. 1997, Rodriguez et al. 1996, Guo et al. 1996). Eines der Hauptsyntheseprodukte von Hepatozyten ist Albumin. Der *alb*-Promotor wurde erfolgreich in transgenen Zelllinien und Tiermodellen zur hepatozytenspezifischen Transgenexpression eingesetzt (Pinkert et al. 1987, Zaret et al. 1988, Linhart et al. 2001, Matsusue et al. 2003, Cole et al. 2002). Laut Expressionsdaten der *GNF*-Datenbank werden die zu *a1at* orthologen *spi1-1* bis *5* und *alb* hochspezifisch in der Leber (und Gallenblase) exprimiert, wobei dabei in erster Linie die Expression in Hepatozyten von Bedeutung sein dürfte (Abb. 11 B und C). In einem transgenen *a1at*-Mausmodell (mit dem humanem Promotor) wurde jedoch unspezifische Transgenexpression nachgewiesen (persönliche Mitteilung Dr. Bettina Peters, Miltenyi Biotec).

Daher wurde in dieser Arbeit zur Identifikation von Hepatozyten und hepatozytenartigen Zellen eine *alb*-Promotor-getriebene Transgenexpression angestrebt.

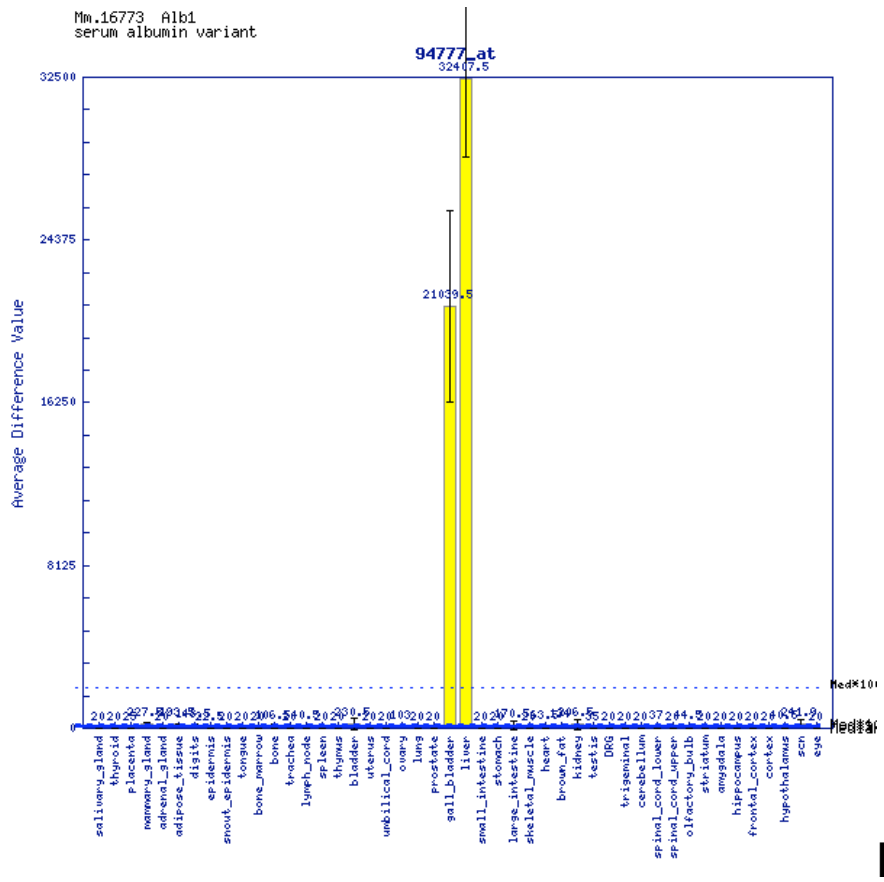
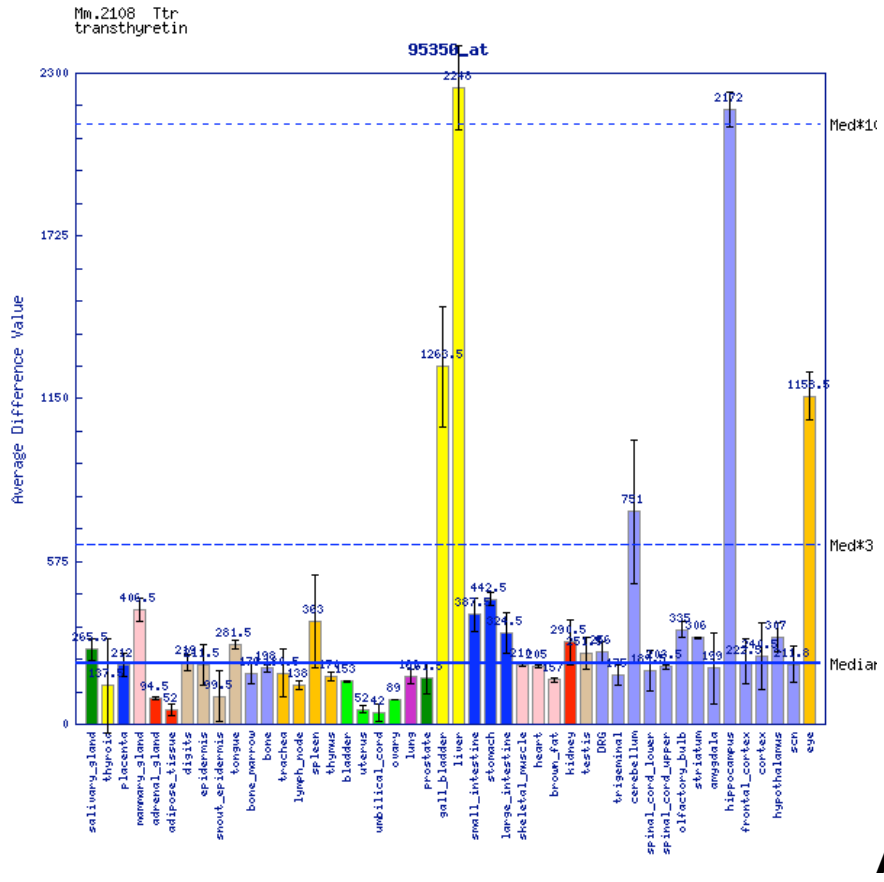
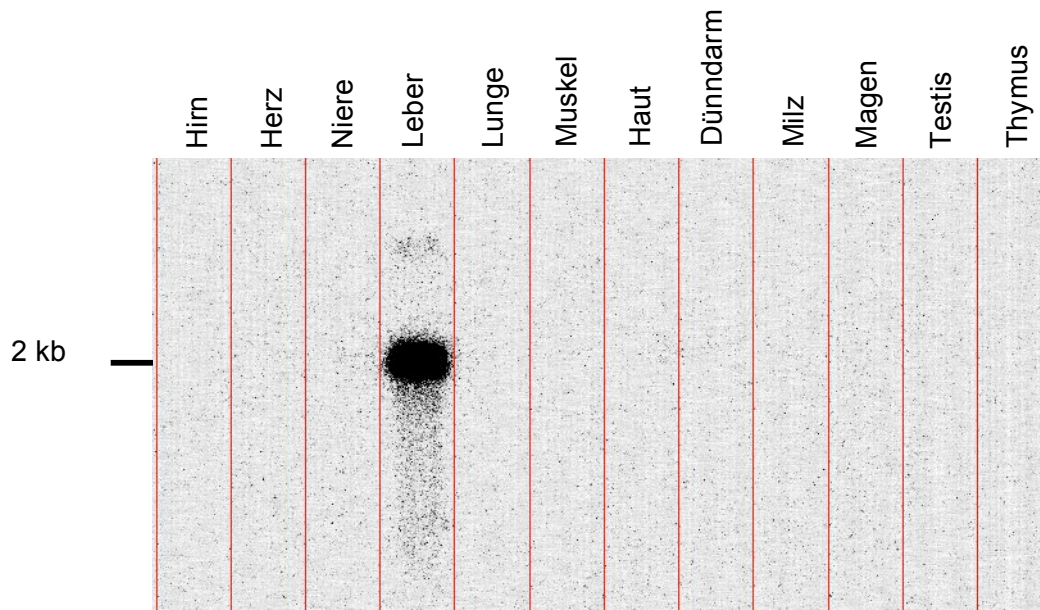


Abb. 11 A+B: Beschriftung und Abb. 11 C siehe nächste Seite.





**Abb. 12: Northern-Blot-Analyse der *albumin*-Expression in zwölf verschiedenen Mausgeweben.** Beim *Mouse polyA+ RNA NorthernBlot* (OriGene) wurden pro Gewebe 2 µg Poly-A+ mRNA eingesetzt. 50 ng <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonde wurden hybridisiert. Die Expositionszeit betrug 5 min. Die reife *albumin*-mRNA besteht aus 2031 bp.

## 4.2.2 Klonierung eines hepatozytenspezifischen Expressionsvektors

### 4.2.2.1 Klonierung des *albumin* Promotors und Enhancers

Der murine *albumin*-Promotor wurde mittels PCR aus genomischer DNA der murinen ES-Zelllinie E14.1 amplifiziert. Die abgeleiteten PCR-Primer enthielten jeweils im 5'-Bereich zusätzliche Restriktionsschnittstellen für spätere Klonierungsschritte. Das generierte Amplifikat reichte von -790 bis +15, bezogen auf den Transkriptionsstart und enthielt somit die von Zaret, (1988) beschriebene Promotor-Region von -787 bis +8. Das PCR-Produkt wurde in *pGEM-T* kloniert und das entstandene Plasmid *pAlb<sup>Pro</sup>* sequenziert (Abb. 14). Die Promotor-Sequenz stimmte mit dem hinterlegten Eintrag des *albumin*-Gens in der NCBI Gen-Bank überein (Entrez GeneID: 11657, Primary source: MGI:87991).

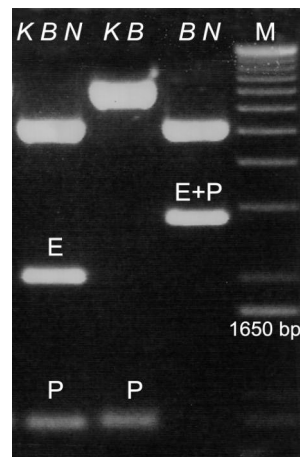
Die Klonierung des *albumin*-Enhancers lieferte das Plasmid *pAlb<sup>Enh</sup>-5-6-Fus* (Abb. 8 A). Der von Pinkert et al. (1987) identifizierte *albumin*-Enhancer hat eine Größe von 1995 bp und liegt im Bereich zwischen -11326 bis -9331, bezogen auf den Transkriptionsstart des *albumin*-Gens. Eine Restriktionsstelle für *NheI* begrenzt das Enhancer-Element im 5'-Bereich. Die Erkennungssequenz für *BamHI* stellt die 3'-Begrenzung dar. Zur Amplifikation des Enhancers wurden die *primer P10-SK* und *P11-SK* eingesetzt. Die Klonierung des 2042 bp großen PCR-Produkts in *pGEM-T* lieferte das Plasmid *pAlb<sup>Enh</sup>-10-11*, das nach



Sequenzierung als Matrize zur PCR mit den Primern *P5SK* und *P6SK* eingesetzt werden konnte. Letztere Primer enthielten die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *DraIII* (*P5SK*) und *KpnI* (*P6SK*) für spätere Klonierungsschritte. Die ursprüngliche *BamHI*-Schnittstelle wurde durch die im Primer *P6SK* vorhandene *KpnI*-Schnittstelle ersetzt. Nach der Klonierung des *P5SK-P6SK*-Amplifikats in *pGEM-T* wurden drei Klone des neu entstandenen Plasmids *pAlb<sup>Enh</sup>-5-6* sequenziert. Dabei wurden in allen Klonen Abweichungen von bis zu drei Basen zu der Referenzsequenz (Entrez GeneID: 11657, Primary source: MGI:87991) festgestellt. Durch Ersetzen des fehlerhaften Abschnitts in *pAlb<sup>Enh</sup>-5-6* zwischen den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *BglII* mit dem entsprechenden fehlerfreien Abschnitt aus *pAlb<sup>Enh</sup>-10-11*, konnte schließlich das Plasmid *pAlb<sup>Enh</sup>-5-6-Fus* kloniert werden, das den *albumin*-Enhancer mit korrekter Basenfolge enthält. Zur Klonierung von *pDisplay-Alb<sup>Pro+Enh</sup>-egfp* mussten nacheinander der klonierte Enhancer und Promotor in *pDisplay-egfp* eingebracht werden (Abb. 14).

Zuerst wurde *pDisplay-Alb<sup>Enh</sup>-egfp* hergestellt. Dazu wurde der CMV-Promotor aus *pDisplay* mit den Restriktionsenzymen *DraIII* und *KpnI* ausgeschnitten und durch den aus *pAlbEnh5-6Fus* mittels *DraIII* und *KpnI* gespaltenen *albumin*-Enhancer ersetzt.

Zur Herstellung von *pDisplay-Alb<sup>Pro+Enh</sup>-egfp* wurde der *albumin*-Promotor mit *KpnI* und *BamHI* aus *pAlbPro* ausgeschnitten und in den gleichermaßen gespaltenen *pDisplay-Alb<sup>Enh</sup>-egfp* einkloniert. Im resultierenden *pDisplay-Alb<sup>Enh+Pro</sup>-egfp* wurden die einklonierten Enhancer- und Promotor-Elemente nochmals per Restriktionsanalyse (Abb. 13) und Sequenzierung verifiziert.



**Abb. 13:** Restriktionsanalyse des Vektors *pDisplay-Alb<sup>Enh+Pro</sup>-egfp*, der den 805 bp *albumin*-Promotor (P) und den 1995 bp *albumin*-Enhancer enthält (E). Die Restriktionsverdau wurden mit den Enzymen *KpnI* (K), *BamHI* (B) und *NheI* (N) durchgeführt. M: 1 kb-PLUS-DNA-Ladder™.

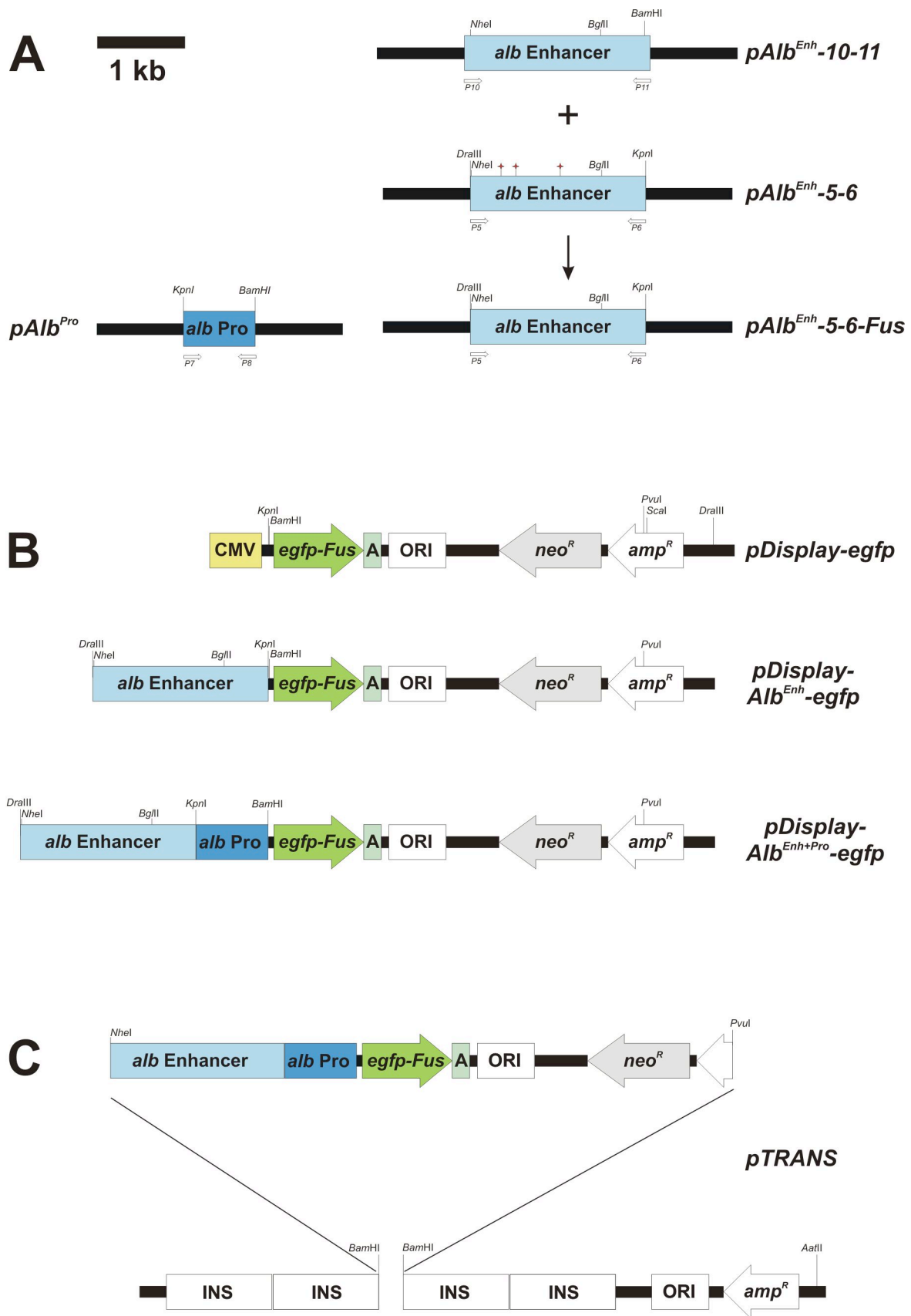
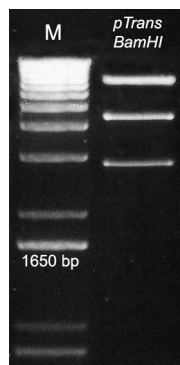


Abb. 14 A-C: Klonierung des Expressionsvektors pTRANS. (A) Klonierung des *albumin*-Promotors und -Enhancers. (B) Klonierung von *pDisplay-Alb<sup>Enh+Pro</sup>-egfp* (C) Klonierung von *pTRANS*. Sternchen: Mutationen in *pAlb<sup>Enh</sup>-5-6*

#### 4.2.2.2 Klonierung des finalen Expressionsvektors *pTRANS*

Für die Herstellung transgener ES-Zellen und Mäuse mit *albumin*-Promotor-getriebener EGFP-Expression wurde schließlich der Expressionvektor *pTRANS* hergestellt (Abb. 14 C). Der Vektor verfügt über zwei Wiederholungen von je zwei Kopien des 1,2 kb großen Huhn- $\beta$ -Globin-Isolator-Bereichs, der heterolog ins Genom eingebrachte Transgene vor Positionseffekten und außerhalb liegenden Enhancer-Elementen abschirmen soll (Recillas-Targa et al. 1999, Recillas-Targa et al. 2002, Burgess-Beusse et al. 2002, Chung et al. 1997, Chung et al. 2002, Felsenfeld et al. 1996). Das Rückgrat des Vektors leitet sich aus dem Konstrukt *pJC13-1* her, das von Dr. Gary Felsenfeld zur Verfügung gestellt wurde. Zwischen die Isolator-Elemente wurde ein *NheI-PvuI*-Fragment aus *pDisplay-Alb<sup>Pro+Enh</sup>-egfp*-Konstrukt eingebracht, um *pTRANS* zu erhalten.

Durch zwei aufeinander folgende Klonierungsschritte mussten zunächst zwei im Vektor *pJC13-1* befindliche Elemente ausgeschnitten werden, um die Ligation mit dem *pDisplay-Alb<sup>Pro+Enh</sup>-egfp*-Fragment vorzubereiten. Durch Restriktion mit *EcoRI* wurde ein 1,1 kb großes Element ausgeschnitten. Durch Religation wurde das Plasmid *pINS-1* erzeugt. Durch *BamHI*-Restriktion wurde das zwischen den Isolatoren befindliche DNA-Element entfernt und die kohäsiven DNA-Enden durch Klenow-Behandlung aufgefüllt, da für die folgende Ligation mit dem *pDisplay-Alb<sup>Pro+Enh</sup>-egfp*-Fragment keine Restriktions-schnittstellen mit kompatiblen kohäsiven Enden zur Verfügung standen. *pDisplay-Alb<sup>Pro+Enh</sup>-egfp* wurde mit *NheI* und *PvuI* gespalten und die entstandenen 5' bzw. 3' Überhänge des 7,15 kb-Fragments ebenfalls durch Klenow-Behandlung entfernt. Die Ligation dieses Fragments mit dem dephosphorylierten, aufgefüllten 7,58 kb *BamHI*-Fragments aus *pINS-1* lieferte *pTRANS* mit einer Größe von 14,73 kb (Abb. 14 C). Die korrekte Klonierung wurde wiederum durch Restriktionsanalyse (Abb. 15) und Sequenzierung überprüft.



**Abb. 15: Restriktionsanalyse des Expressionsvektors *pTRANS* mit *BamHI*.** M: 1 kb-PLUS-DNA-Ladder™. Die Restriktion lieferte DNA-Fragmente der Größen 7,58 kb, 4,34 kb und 2,81 kb.

### 4.2.3 Funktionelle Analyse des Expressionsvektors in der murinen Hepatomzelllinie HEPA-1-6

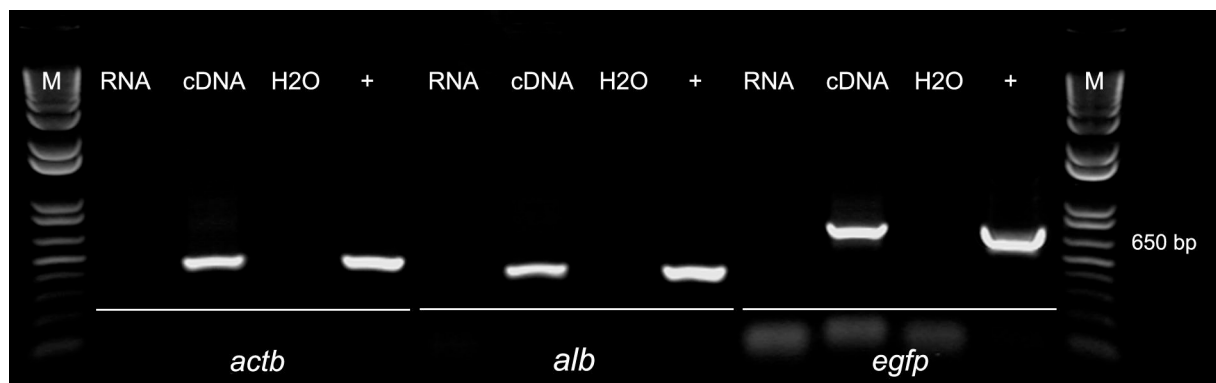
Die murine Hepatomzelllinie HEPA-1-6 exprimiert eine Vielzahl von Serumproteinen, darunter auch Serum-Albumin (Darlington et al. 1986, Darlington et al. 1982) und besitzt daher die Kompetenz, Genexpression vom *albumin*-Promotor zu initiieren. Daher bot sich diese Zelllinie als Testsystem für den Expressionsvektor *pTRANS* an.

#### 4.2.3.1 Nachweis der *egfp*-Transkription in transgenen HEPA-1-6-Zellen

Durch Elektroporation mit dem Vektor *pTRANS* konnten stabile HEPA-1-6-Transfektanten hergestellt werden. Nach Genotypisierung konnten positive Klone im Folgenden hinsichtlich der Funktionalität der *albumin*-getriebenen *egfp*-Expression phänotypisch charakterisiert werden.

Zum qualitativen Nachweis der Genexpression wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt. Zur Herstellung von cDNA wurde die Gesamt-RNA aus Zellen isoliert und vor der reversen Transkription einem *DNAseI*-Verdau unterzogen, um genomische DNA-Reste vollständig zu entfernen. Dieser Schritt war erforderlich, da für das *egfp*-Gen aufgrund der fehlenden Intron-Exon-Struktur im *egfp*-Expressionskonstrukt keine Intron-überspannenden Primerpaare abgeleitet werden konnten. Als Kontrolle der RT-PCR wurden parallel PCRs mit Primern für das  *$\beta$ -actin*-Gen (*actb*) und zur Kontrolle der *albumin*-Expression (*alb*) in den HEPA1-6-Zellen zusätzlich PCRs mit *albumin*-spezifischen Primern durchgeführt.

Die Albumin-Promotor getriebene Expression des *egfp*-Gens konnte in HEPA-1-6-Zellen nachgewiesen werden. Das PCR-Amplifikat hatte eine Größe von 732 bp. Somit stand neben der Fluoreszenzmikroskopie und der Durchflusszytometrie ein alternatives und sensitives Verfahren zum Nachweis der Funktionalität des Expressionvektors zur Verfügung. Parallel transfizierte R1-ES-Zellen, die kein *albumin* transkribieren, zeigten wie erwartet auch keine *egfp*-Transkripte (nicht gezeigt).

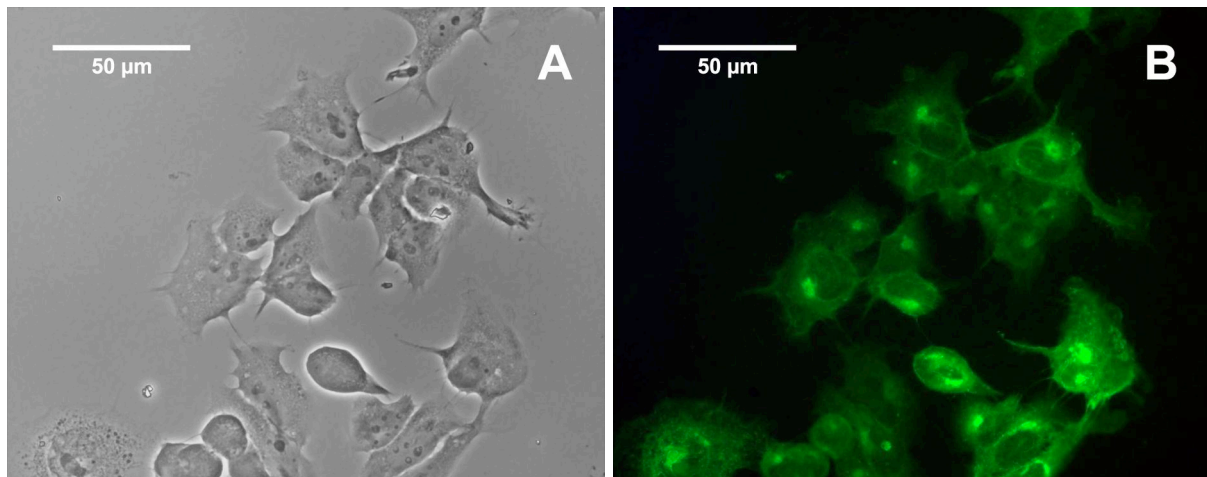


**Abb. 16: Qualitative RT-PCR-Analyse stabil transfizierten HEPA-1-6-Zellen zum Nachweis der *albumin*- und *egfp*-Transkription.** M: 1 kb-PLUS-DNA-Ladder™; +: Plasmid-Kontrolle: je 0,5 ng Plasmid mit klonierten cDNAs der jeweilig untersuchten Gene; *actb*: 442 bp; *alb*: 383 bp; *egfp*: 732 bp

#### 4.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Zum Nachweis des EGFP-Proteins wurden zwei fluoreszenzbasierte Verfahren angewandt: Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie.

Durch Fluoreszenzmikroskopie konnte in mit *pTRANS* stabil transfizierten HEPA-1-6-Klonen, nach dem Nachweis von *egfp*-Transkripten, die Expression des funktionellen EGFP-Proteins nachgewiesen werden (Abb. 17 A+B).



**Abb. 17 A+B:** Repräsentative Phasenkontrast- (A) und fluoreszenzmikroskopische (B) Aufnahme von HEPA-1-6 Zellen nach stabiler Transfektion mit *pTRANS* (400x).

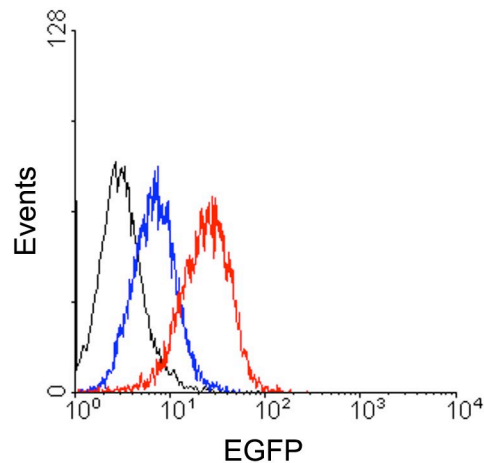
#### 4.2.3.3 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der relativen Expressionsstärken von transgenen HEPA-1-6-Klonen untereinander und im Vergleich zu nicht-transfizierten WT-Klonen wurden Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt.

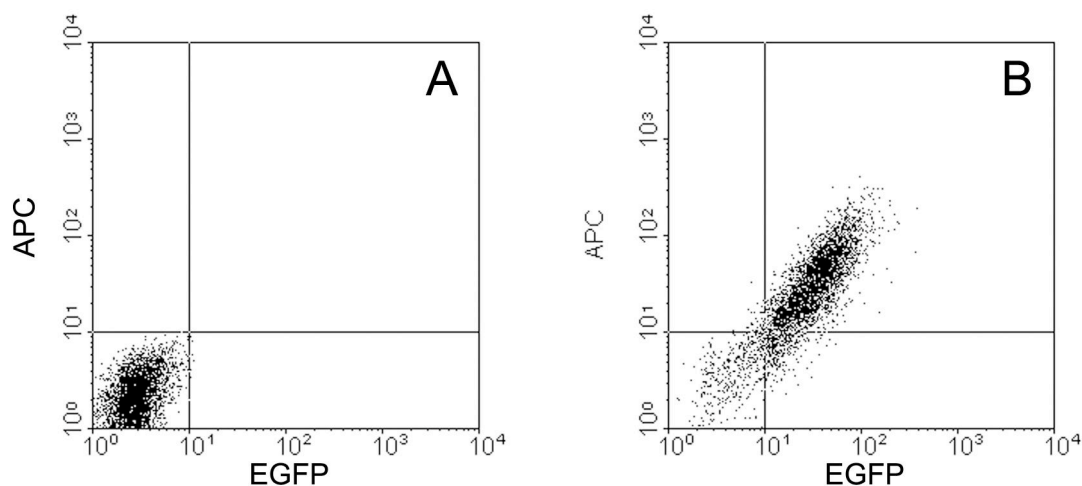
Die untersuchten Klone wiesen variable EGFP-Expressionsstärken auf. Einige der Klone zeigten deutliche EGFP-Fluoreszenz, während andere nur ein schwaches Expressionsniveau aufwiesen (Abb. 18), was gleichbedeutend mit einer geringeren EGFP-Präsenz auf der Zelloberfläche war.

Durch Antikörperfärbungen mit anti-EGFP-Kaninchen-Serum und einem zu diesem Zweck hergestellten sekundären Ziege-anti-Kaninchen-APC-Konjugats konnte auch bei *pTRANS*-transfizierten Zellen die korrekte Oberflächenlokalisation des EGFP nachgewiesen werden (Abb. 19). Durch Einsatz eines APC-Signalamplifikationsverfahrens (APC-FASER-KIT, Miltenyi Biotec) gelang es, das detektierte APC-Fluoreszenzsignal um den Faktor 4 zu steigern (ohne Abb). Bei dem Verfahren werden in aufeinander folgenden Reaktionen

mehrere APC-Moleküle an die ursprünglich vorhandenen APC-Moleküle des Antikörperkonjugats angehängt. Somit erlaubt das Verfahren bei Verwendung von anti-APC-MACS-*beads* eine APC-basierte MACS-Aufreinigung indirekt APC-markierter Zellen, die über wenig Primärepitope verfügen. Damit bestand die Möglichkeit, auch schwach exprimierte Epitope im Durchflusszytometer zu detektieren und für ein MACS-Verfahren nutzbar zu machen.



**Abb. 18:** Durchflusszytometrische Analyse der relativen EGFP-Expressionsstärken zweier *pTRANS* transfizierter HEPA-1-6-Klone (blau und rot) im Vergleich zu nicht-transfizierten HEPA-1-6-WT-Zellen (schwarz).

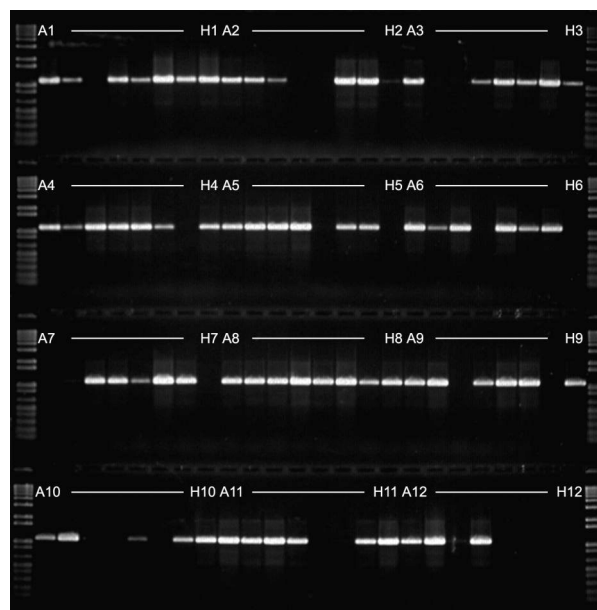


**Abb. 19:** Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Lokalisation eines stabil transfizierten *pTRANS*-HEPA-1-6-Klons (B) und eines WT-Klons (A) als Kontrolle. Durch Immunmarkierung unfixierter Zellen konnte beim transgenen Klon extrazellulär präsentiertes EGFP nachgewiesen werden (B).

#### 4.2.4 Herstellung transgener *pTRANS*-ES-Zelllinien zur Etablierung und Optimierung der *in-vitro*-Differenzierung von ES-Zellen zu Hepatozyten

Die Wahl der HM1-ES-Zelllinie (Magin et al. 1992) für die *in-vitro*-Differenzierungsexperimente basierte auf folgenden Abwägungen: Hinsichtlich ihrer Handhabbarkeit unter normalen ES-Kulturbedingungen war sie den anderen zur Verfügung stehenden Linien SV129, R1 und E14.1 überlegen, da sie im Gegensatz zu diesen zum Erhalt ihrer Pluripotenz nicht auf mitoseinaktivierten embryonalen Fibroblasten kultiviert werden muss. Die spontane Differenzierungsneigung der Zellen ist äußerst gering und die Zellen zeigten eine sehr homogene Klonmorphologie. Auch eine Expression des endodermalen Markers *hnf3 $\beta$*  war nicht nachweisbar (Abb. 22), wodurch der morphologische Eindruck einer geringen spontanen Differenzierung bestätigt wurde.

HM1-ES-Zellen wurden mit *pTRANS* elektroporiert und G418-resistente Klone mittels PCR genotypisiert (Abb. 20).



**Abb. 20: PCR-Analyse zur Genotypisierung *pTRANS*-transfizierter HM1-ES-Zellklone.** Die Probenbezeichnung bezieht sich auf die ursprünglichen Positionen der Klone in der 96-well-Platte: A1 bis H12. 71 der insgesamt 92 analysierten G418-resistenten Klone trugen das Transgen. Die Genotypisierungs-PCR mit den Primern *P7SK* und *P34SK* liefert ein 1131 bp-Amplifikat.

Insgesamt 30 PCR-positive Klone wurden aufgrund morphologischer Eigenschaften ausgewählt, expandiert, kryokonserviert und für nachfolgende *in-vitro*-Differenzierungsanalysen verwendet.

### 4.3 *in-vitro*-Differenzierung von murinen ES-Zellen zu Hepatozyten

Mit der Generierung der *pTRANS*-transgener HM1-ES-Zellen war die Voraussetzung für die Herstellung und anschließende Isolierung EGFP-positiver Hepatozyten aus ES-Zellen gegeben. Zur Herstellung von Hepatozyten *in vitro* musste jedoch zunächst ein geeignetes Differenzierungsprotokoll etabliert werden.

#### 4.3.1 Etablierung eines *in-vitro*-Differenzierungsprotokolls

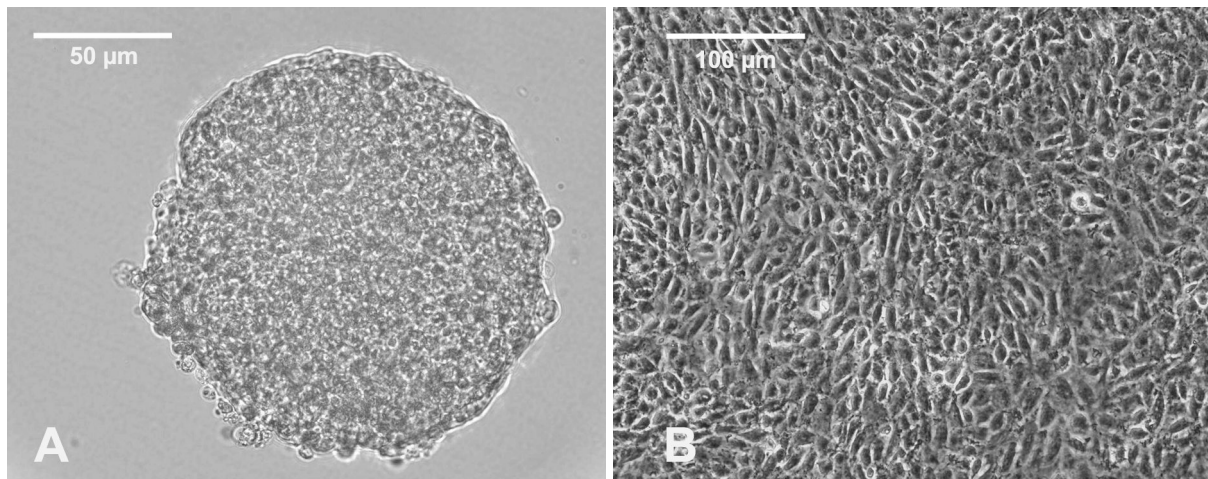
Im Rahmen der Etablierung eines reproduzierbaren Differenzierungsprotokolls zur Generierung von Hepatozyten aus embryonalen Stammzellen wurden diverse zum Zeitpunkt der Analyse publizierte Protokolle evaluiert und variiert. Verglichen wurden die Protokolle nach Yamada (2002), Hu (2004), Kuai (2003), Shirahashi (2004), Rambhatla (2003), Kubo (2004) und Hamazaki (2003).

Für die Verwendung des Protokolls nach *Kubo et al.* als Grundlage für die Adaption eines stabilen Differenzierungsprotokolls sprach u.a. die reproduzierbare Entstehung von Hepatozyten-Vorläuferzellen (Kuai et al. 2003, Rambhatla et al. 2003), die aufgrund ihrer Morphologie stets ab Tag acht bis neun der Differenzierung zu beobachten waren (Abb. 21) und die stabile Albumin-Expression nach 15-, 20- (Abb. 22) oder 25-tägiger Differenzierung. Zur Induktion der Differenzierung wurden ES-Zellen mit Trypsin geerntet, und für 2,5 Tage in einem Serum-haltigen Differenzierungsmedium ohne den für die Erhaltung der Pluripotenz entscheidenden *leukemia inhibitory factor* (LIF) in Petri-Schalen kultiviert. Durch die Unfähigkeit zur Adhärenz in Petri-Schalen, aggregierten die ES-Zellen in der Suspensionskultur zu *embryoid bodies*. Nach dieser Serum-Induktionsphase wurden die Zellen fortan ohne Serum kultiviert und nach insgesamt sechs Tagen in Dexamethason-haltigem Medium auf mit Matrigel beschichteten Zellkulturschalen ausgesät. Ab Tag 14 waren eine Vielzahl hepatozytenspezifischer Transkripte detektierbar (Abb. 22).

##### 4.3.1.1 Morphologische Eigenschaften hepatozytenartiger Vorläuferzellen

Zur Beurteilung des Differenzierungsgrades der *in-vitro*-Differenzierungskultur wurden regelmäßig mikroskopische Kontrollen vorgenommen. Nach Ausplattierung der *embryoid bodies* (Abb. 21 A) auf mit Matrigel (Beckton Dickinson) beschichteten Zellkulturschalen konnten mit zunehmender Kultivierungsdauer Areale regelmäßig geformter epithelialer Zellen beobachtet werden, die morphologisch Ähnlichkeit zu fötalen Hepatozyten aufwiesen (Abb. 21 B, vergl. Rambhatla et al. (2003), Kuai et al. (2003)).



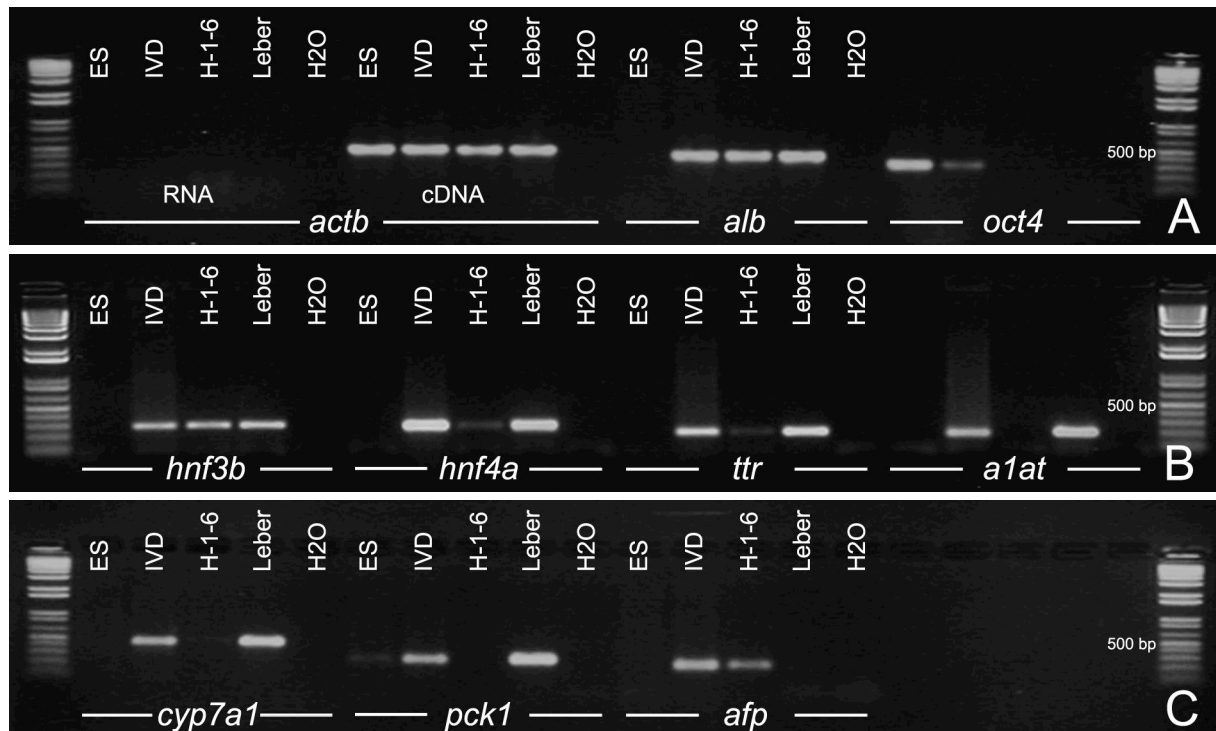


**Abb. 21 A+B:** Durchlichtaufnahme von *in-vitro*-differenzierten ES-Zellen. A: *embryoid body* nach dreitägiger Suspensionskultur, B: *in-vitro*-Differenzierungs-Kultur nach elftägiger Kultivierung. Größere Areale von Zellen zeigen typische morphologische Eigenschaften epithelialer bzw. hepatozytenartiger Zellen.

#### 4.3.1.2 Genexpressions-Analyse zur *in-vitro*-Differenzierung (IVD)

Neben den morphologischen Begutachtungen der Zellen wurde eine weitere qualitative Methode zur Beurteilung des Differenzierungsgrades benötigt. Durch semi-quantitative RT-PCR wurden verschiedene Parameter des Differenzierungsprotokolls schrittweise optimiert. Als Hauptindikator für eine erfolgreiche Differenzierung zu Hepatozyten diente dabei die Stärke der Albuminexpression. So konnte eine optimale Aussaatdichte der Zellen in der initialen Suspensionskultur von  $10^4$  Zellen/ml ermittelt werden. Ein Austausch der Differenzierungsmatrices Matrigel (BD) durch Kollagen I (Sigma-Aldrich) (Shirahashi et al. 2004) führte weder unter morphologischen Kriterien noch in Bezug auf die Albumin-Expression zu stärkerer Hepatozyten-Differenzierung.

Das finale Differenzierungsprotokoll wurde durch eine umfassende semi-quantitative RT-PCR-Analyse überprüft. RNAs von HM1-Zellen wurden vor und nach Differenzierung nach *DNaseI*-Verdau revers transkribiert. Zum Vergleich wurde cDNA aus RNA von HEPA-1-6-Zellen und adulter Mausleber hergestellt. Daraufhin wurden eine Vielzahl von relevanten Markergenen für die Klassifizierung der Hepatozyten-Differenzierung in PCR-Analysen verglichen (Abb. 22 A-C).



**Abb. 22 A-C: Semi-quantitative RT-PCR-Expressionsanalyse Differenzierungs-relevanter Gene.** Repräsentative Darstellung der RNA-Expression von undifferenzierte WT-ES-Zellen (ES), *in vitro*-differenzierte ES-Zellen nach 20-tägiger *in-vitro*-Differenzierung (IVD), HEPA-1-6-Zellen (H-1-6), adulte Leber (Leber) und eine H<sub>2</sub>O-Kontrolle (H2O). Die Expressionsanalyse wurde als technisches Replikat durchgeführt. Die ES- und die IVD-Proben stellen *pools* aus je vier unabhängigen Klonen dar. (A) *actb*, RNA-Kontrolle (RNA) und cDNA-Kontrolle (cDNA), *alb*, *oct4*; (B) *hnf3b*, *hnf4a*, *ttr*, *a1at*; (C) *cyp7a1*, *pck1*, *afp*.

Als Kontrolle der RNA-Präparation und cDNA-Synthese diente eine  $\beta$ -*actin*- (*actb*)-PCR mit der DNaseI-behandelten RNA und der daraus hergestellten cDNA. *albumin* (*alb*), der wichtigste Marker für das verwendete transgene Differenzierungssystem, war nicht in den Ursprungs-ES-Zellen, aber in den daraus differenzierten Kulturen, der Hepatomzelllinie sowie am stärksten in der adulten Leber detektierbar. *oct4* (*octamer-binding transcription factor 3a*), der zentrale ES-Zell Pluripotenzmarker (Rossant 2001) war stark in den ES-Zellen und noch schwach in den differenzierten Kulturen exprimiert, was auf minimale Reste nicht-differenzierter ES-Zellen in der heterogenen Kultur hindeutet. *hnf3 $\beta$*  (*hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$* ), *ttr* (*transthyretin*), *a1at* (*alpha-1-antitrypsin*), *pck1* (*phosphoenolpyruvat carboxykinase*) und *cyp7a1* (*cytochrom P450 7a1*) waren in den ES-Zellen nicht exprimiert, in den IV-Kulturen deutlich detektierbar, in den Hepatomzellen jeweils schwächer oder nicht detektierbar und in der Gesamtleber - wie erwartet - stärker exprimiert. Bemerkenswert war dabei insbesondere die *cyp7a1*-Expression der IVD-Kultur, da die Cytochrom-Expression ein essentielles Kriterium für die Funktionalität von Hepatozyten darstellt (Lavon & Benvenisty 2005) und in kultivierten Hepatozyten und Hepatomzelllinien meist nicht aufrechterhalten wird, wie es in den HEPA-1-6-Zellen zu beobachten war. *hnf4a* war erstaunlicherweise in den IVD-Kulturen ähnlich stark exprimiert wie in der Gesamtleber. *afp* als Endoderm-Marker

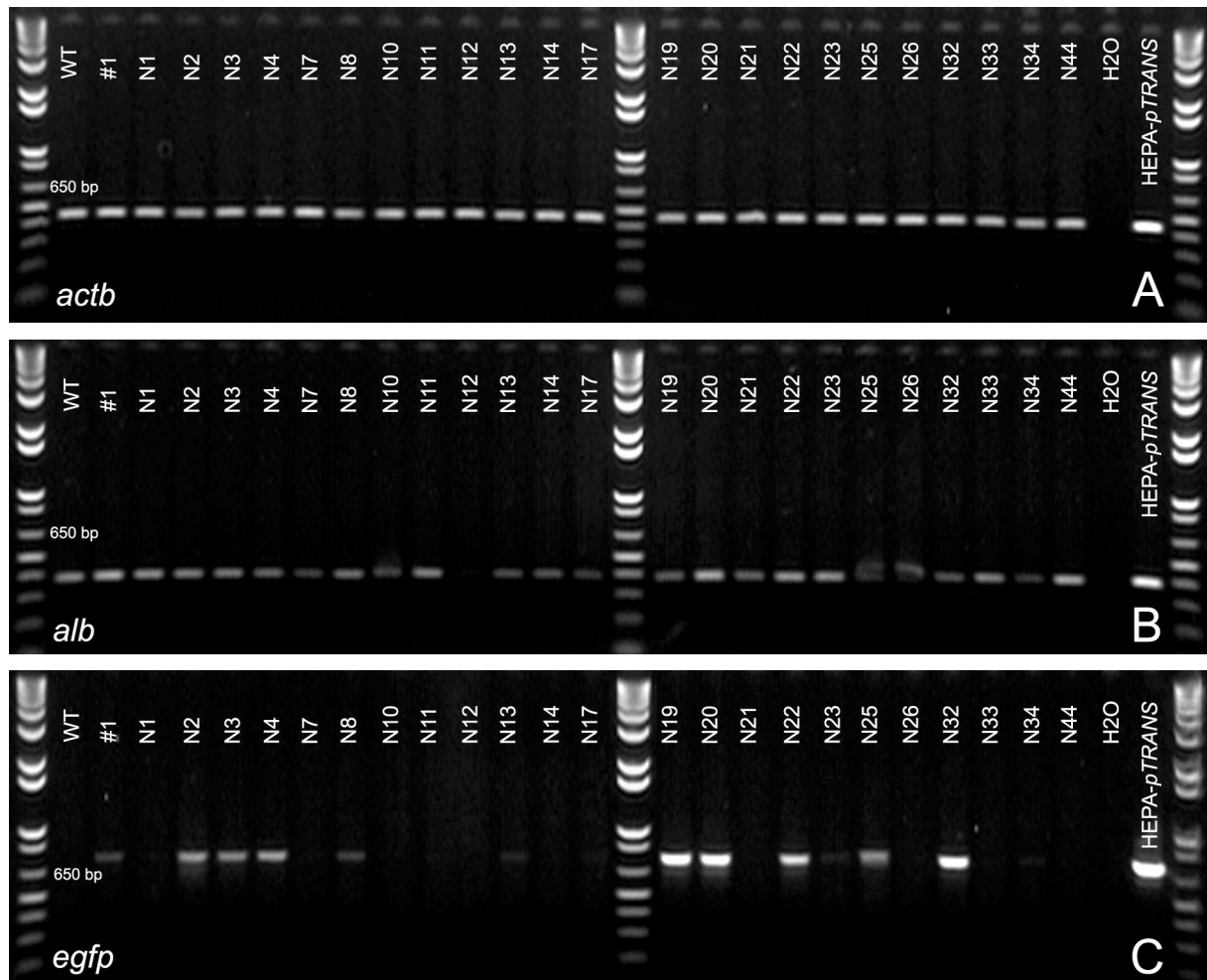
und Marker fötaler Hepatozyten bzw. klinischer Marker für dedifferenzierte und proliferierende Hepatozyten war ausschließlich in der Hepatomzelllinie und in den ID-Kulturen nachweisbar.

Somit konnte gezeigt werden, dass in der *in-vitro*-Differenzierungskultur, neben anderen Zelltypen, Zellen generiert wurden, die eine Vielzahl charakteristischer Transkripte fötaler oder adulter Hepatozyten aufwiesen und daher als hepatozytenartige oder Hepatozyten-Vorläuferzellen bezeichnet werden konnten. Das modifizierte Protokoll nach Kubo (2004) konnte daher zur Generierung von hepatozytenartigen Zellen und auch zur Suche nach einem transgenen Klon mit *albumin* abhängiger EGFP-Expression genutzt werden.

#### **4.3.2 Analyse der Transgenexpression in stabil transfizierten ES-Zell-Klonen**

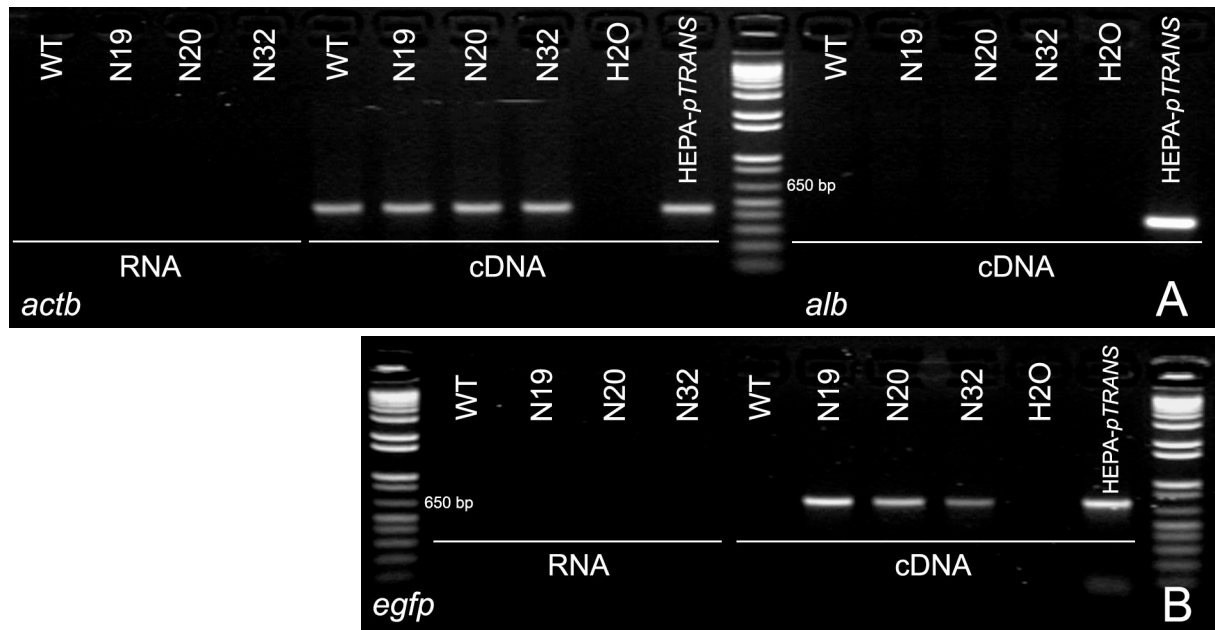
Die Erfahrungen der unterschiedlich effizienten Transgenexpression in der Hepa-1-6-Zelllinie (Abb. 18) erforderte eine Untersuchung einer Vielzahl unabhängiger HM1-Klone. 24 *pTRANS*-transfizierte und genotypisierte Klone wurden daher *in-vitro*-differenziert und mittels semi-quantitiver-RT-PCR-Analyse hinsichtlich ihrer *albumin*- und *egfp*-Expression analysiert (Abb. 23 A-C).

In 24 von 25 *in-vitro*-Differenzierungsansätzen konnte eine deutliche *Albumin*-Expression und somit indirekt die Entstehung von hepatozytenartigen Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23 B). Bei zwölf der 24 transgenen Klone war eine schwache bis starke *egfp*-Transkription detektierbar (Abb. 23 C).



**Abb. 23 A-C:** *actb* (A), *alb* (B) und *egfp*-Expression (C) in *in-vitro*-differenzierten HM1-*pTRANS*-Klonen. Als Kontrollen wurden RT-PCRs von einem *in-vitro*-differenzierten HM1-WT-Klon und einem *pTRANS*-transfizierten HEPA-1-6-Klon durchgeführt. Die Ergebnisse wurden unabhängig reproduziert.

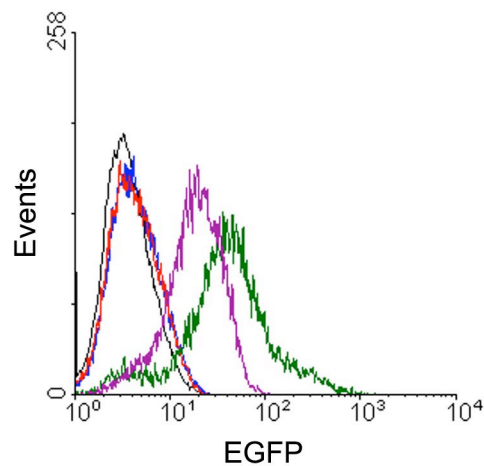
Alle *egfp*-exprimierenden Klone wurden daraufhin hinsichtlich ihres Expressionsverhaltens unter ES-Zellkulturbedingungen untersucht, um die Spezifität der *albumin*-abhängigen *egfp*-Expression zu überprüfen. Die stark exprimierenden Klone N19, N20 und N32 (Abb. 24), aber auch die weniger stark *egfp*-exprimierenden Klone N2, N3, N4, N22, N25 (nicht gezeigt) zeigten bereits unter ES-Kulturbedingungen bei fehlender *albumin*-Expression eine *egfp*-Basalexpression. Somit war fraglich, ob die transfizierten ES-Zellklone für die Identifikation von *albumin*-exprimierenden Zellen nach *in-vitro*-Differenzierung genutzt werden konnten, da das Kriterium der Expressionspezifität *in vitro* nicht gegeben war.



**Abb. 24 A+B:** *alb* (A) und *egfp*-Expression (B) in HM1-pTRANS-Klonen unter ES-Kultur-Bedingungen. Als Kontrollen wurden RT-PCRs von einem pTRANS-transfizierten HEPA-1-6-Klon durchgeführt. RNA: PCR-Kontrolle der RNA auf DNA-Kontamination, cDNA: PCR mit cDNA.

Trotz der relativ starken *efgp*-Transkription war in allen lichtmikroskopisch untersuchten *in-vitro*-Differenzierungsansätzen transgener ES-Zellklone nur diffuse EGFP-Fluoreszenz zu erkennen. Erschwert wurden die Analysen zudem durch die hohe Autofluoreszenz der teils mehrschichtig wachsenden Kulturen im grünen Wellenlängenbereich (nicht gezeigt).

Durch durchflusszytometrische Analysen konnte im Folgenden gezeigt werden, dass die beobachtete Basalexpression des *egfp* im ES-Zellstadium jedoch nicht zur Produktion detektierbaren EGFP-Proteins führte (Abb. 25). Darüberhinaus konnte in keinem der untersuchten ES-Zellklone nach *in-vitro*-Differenzierung EGFP-Protein per Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, auch dann, wenn zuvor eine Signalamplifikation mit dem FASER-Kit (Miltenyi Biotec) durchgeführt wurde (nicht gezeigt). Daher konnten die Klone nicht, wie angestrebt, zur Isolierung hepatozytenartiger Zellen aus *in-vitro*-differenzierten ES-Zellen genutzt werden, da weder die Expressionsspezifität noch eine ausreichende Expressionsstärke des Transgens gegeben war.



**Abb. 25: Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression in *pTRANS*-ES-Zellklonen unter ES-Kulturbedingungen.** Schwarz: HM1-WT, blau: HM1-*pTRANS*-N19, rot: HM1-*pTRANS*-N32, magenta: HEPA-1-6-*pTRANS*, grün: HM1-*pDisplay-egfp* (CMV-Promotor)

#### 4.4 Herstellung transgener Mäuse durch Vorkerninjektion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein transgenes Mausmodell durch Injektionen des Expressionsvektors *pTRANS* in die Vorkerne befruchteter Oozyten hergestellt. Die Herstellung transgener Mäuse diente zur Evaluierung der Gewebsspezifität des Expressionskonstrukts *pTRANS* *in vivo*. Bei der Oozyteninjektion wird der linearisierte Expressionsvektor in einen der beiden Vorkerne, der in der Nacht zuvor befruchteten Oozyten, injiziert. Die manipulierten Oozyten werden daraufhin in das Infundibulum einer scheinsschwangeren Maus eingebracht und reifen nach erfolgreicher Einnistung zum Embryo heran.

Die Herstellung transgener Mäuse per Oozyteninjektion erfolgte, nachdem die Funktionalität des Expressionskonstrukts *pTRANS* in der Hepatomzelllinie HEPA-1-6 nachgewiesen worden war. Parallel zur Herstellung der transgenen ES-Zellen wurden die Vorkerninjektionen durchgeführt. Die DNA musste dafür von besonderer Reinheit sein. Dazu wurde der Expressionsvektor nach Linearisierung im Agarosegel aufgetrennt, durch Elektroelution aus dem Agarosegel isoliert, mit Isopropanol gefällt und durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine Molekularsiebfiltration (Microcon-Säulen, Millipore) für die Injektion vorbereitet. Zur Injektion wurde die DNA in einer Konzentration von 2 ng/μl in Injektionspuffer eingestellt.

Als Ammen dienten Weibchen des Stammes CD1, die nach Verpaarung mit vasktomierten CD1-Männchen eine Scheinschwangerschaft entwickelten. Die befruchteten Oozyten wurden aus Verpaarungen von Mäusen des Stammes FVB gewonnen und nach

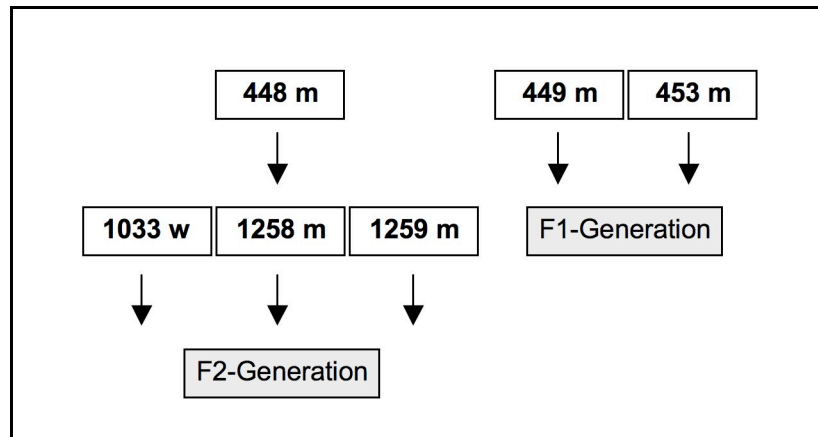
Manipulation in das Infundibulum scheinchwanger Mäuse reimplantiert, die 19 bis 20 Tage später warfen. Vier Wochen später konnte der Wurf genotypisiert werden.

#### 4.4.1 Genotypisierung

Die Genotypisierungen erfolgten mittels PCR, nachdem die Verlässlichkeit der PCR-Reaktion durch Southern-Hybridisierung verifiziert worden war (nicht gezeigt). Von 32 lebenden Nachkommen waren fünf Tiere (15,6 %) transgen, darunter vier Männchen. Zwei der vier Männchen brachten keine transgenen Nachkommen in der F1-Generation hervor. Verpaarungen der anderen zwei Männchen mit FVB-WT-Weibchen und dem transgenen Weibchen mit FVB-WT-Männchen brachten lebensfähige, fertile Nachkommen hervor (Tab. 1). F1-Nachkommen der Mäuse 449 und 453 trugen in ca. 50 % der Fälle das Transgen, bei den F1-Nachkommen von Maus 448 waren die transgenen Tiere jedoch stark unterrepräsentiert. Daher wurden für die weitere Zucht der Linie zwei der positiven F1-Nachkommen verwendet (1033 und 1259), die ihrerseits das Transgen annähernd im erwarteten Mendelschen Verhältnis weitergaben, wenn auch, aufgrund der geringen Tierzahl in der F2-Generation, keine statistisch verlässliche Aussage möglich war (Abb. 27). Die Nachkommen dieser Tiere und die F1-Tiere der Linien 449 und 453 konnten zur Analyse der Transgenexpression *in-vivo*-Expression verwendet werden (Abb. 26).

**Tab. 1: Transgene Mauslinien nach Oozyteninjektion von *pTRANS*.** Angegeben sind die laufenden Nummern der Mäuse (fett) und die Zahl der Nachkommen. m: männlich, w: weiblich.

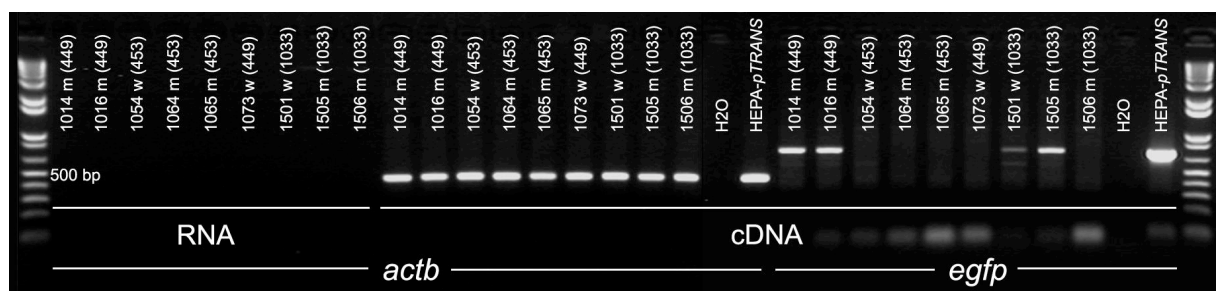
Stammhalter	F1- Generation	Transgene Nachkommen / Nachkommen insgesamt	Geschlecht der transgenen Nachkommen	
<b>266 m</b>	49	0 / 49		
<b>448 m</b>	33	3 / 33	2 m	1 w
	<b>1003 w</b>	6 / 8	3 m	3 w
	<b>1259 m</b>	4 / 14	2 m	2 w
<b>449 m</b>	29	15 / 29	9 m	6 w
<b>452 w</b>	16	0 / 16		
<b>453 m</b>	23	13 / 23	5 m	8 w



**Abb. 26:** Schema zur Zuchtstrategie der drei transgenen Mauslinien 448, 449 und 453, die nach Oozyteninjektion von *pTRANS* generiert wurden. Angegeben sind die laufenden Nummern der Mäuse. m: männlich, w: weiblich. Im Falle der Linien 449 und 453 konnte die F1-Generation, im Falle der Linie 448 konnte aufgrund der schlechten Transgenweitergabe des Stammhalters 448 erst die F2-Generation analysiert werden.

#### 4.4.2 Analyse der Transgen-Transkription *in vivo*

Die *egfp*-Transkription in der Leber transgener F1-Tiere der Linien 449 und 453 und F2 Tiere der Linie 448 (1033) wurden mittels RT-PCR analysiert (Abb. 27). Die cDNA-Herstellung erfolgte aus Gesamt-RNA der Leber. Insgesamt wurden in sieben von 19 untersuchten Tieren *egfp*-Transkripte nachgewiesen. In den vier getesteten Nachkommen von Maus 453 war keine Expression nachweisbar. Das Expressionsverhalten innerhalb der anderen Linien variierte stark zwischen unterschiedlichen Individuen. Die Unterschiede der Expressionsstärke waren unabhängig vom Geschlecht der Tiere. Die *egfp*-Expression war in allen untersuchten Tieren deutlich schwächer als in der parallel untersuchten transgenen HEPA-1-6-Zelllinie.



**Abb. 27:** RT-PCR-Analyse der *egfp*-Expression in der Leber transgener Mäuse der Linien 448 (1033), 449 und 453. Die Daten von 9 der 19 untersuchten Tiere sind abgebildet. m: männlich, w: weiblich, in Klammern angegebene Nummern verweisen auf das transgene Elterntier (Stammhalter). Hepa-*pTRANS*: *pTRANS*-transfizierter HEPA-1-6-Klon. Repräsentative Darstellung zweier Experimentwiederholungen.



#### 4.4.3 EGFP-Immunpräzipitations (IP)-Western-Blot-Analyse von Leber-Lysaten

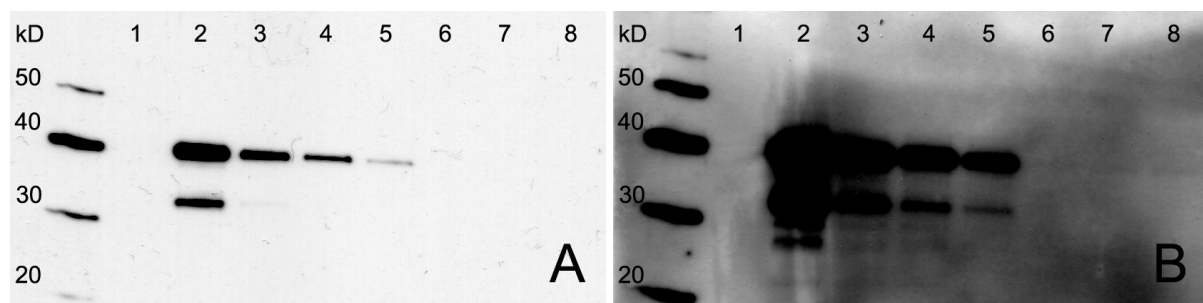
Zur Analyse der resultierenden EGFP-Proteinexpression wurden EGFP-IP-Western-Blot-Analysen von Leberextrakten durchgeführt. Lysate von 20 mg Gesamtlebergewebe wurden vergleichend mit Lysaten von  $5 \times 10^6$  bis  $5 \times 10^5$  transgenen HEPA-1-6-Zellen und  $5 \times 10^6$  WT Zellen analysiert.

Zur Anreicherung des EGFP-Proteins aus dem Proteinrohextrakt wurde eine Immunpräzipitation mit anti-EGFP-Antikörpern durchgeführt. Nach PAGE wurden die Proteine per Western-Blot auf eine PVDF-Membran überführt. Die Detektion des EGFP-Proteins erfolgte mit einem anti-EGFP-*horse radish peroxidase* (HRP) Antikörper (Miltenyi Biotec) und dem ECL-Kit (GE Healthcare).

In den Proben der Mäuse 1014, 1016 und 1505, die die stärkste *egfp*-Transkription aufgewiesen hatten, konnten nur minimale Mengen von EGFP nachgewiesen werden (Abb. 28). Im Gegensatz dazu war bei der transgenen HEPA-1-6 Linie selbst bei der Probe mit der geringsten Ausgangsproteinmenge eine deutliche EGFP-Bande zu erkennen.

**Tab. 2: Probenübersicht für die EGFP-IP-Western-Blot-Analyse (Abb. 28).** Die für die IP eingesetzten Proteinmengen wurden durch einen BCA-Proteinassay bestimmt.

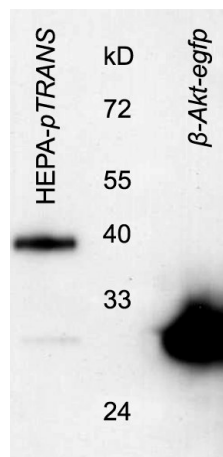
Spur	Probe	Zellzahl	Gewebe (mg)	$\mu\text{g Protein / IP}$
1	HEPA WT	$5 \times 10^6$		125,4
2	HEPA-1-6- <i>pTRANS</i>	$5 \times 10^6$		120,0
3	HEPA-1-6- <i>pTRANS</i>	$2,5 \times 10^6$		60,0
4	HEPA-1-6- <i>pTRANS</i>	$0,5 \times 10^6$		24,0
5	HEPA-1-6- <i>pTRANS</i>	$0,25 \times 10^6$		12,0
6	Maus 1014		20	639,2
7	Maus 1016		20	601,4
8	Maus 1505		20	553,4



**Abb. 28 A + B: EGFP-IP-Western-Blot-Analyse von Gesamtleberlysaten von *pTRANS*-transgenen Mäusen und *pTRANS*-transgenen HEPA-1-6 Zellen.** A: 15 min Expositionszeit, B: 72 h Expositonszeit. Das EGFP-Fusionsprotein hat eine Größe von 38,3 kD. kD: *MagicMark*<sup>TM</sup> Western - Standard. Spurbelegung siehe Tab. 2.

Somit konnte in den per Oozyteninjektion generierten transgenen Mauslinien keine wesentliche EGFP-Proteinexpression in der Leber nachgewiesen werden, obwohl per RT-PCR-Analysen *egfp*-Transkripte nachgewiesen worden waren. Dieses Mausmodell war daher nicht geeignet um Erkenntnisse über die Spezifität des *albumin*-Promotor-getriebenen *egfp*-Konstrukts zu gewinnen, da bereits im designierten Zielorgan - mit optimalen Voraussetzungen für eine starke Expression - nur eine unzureichende Menge des Transgens gebildet wurde.

Zur Einschätzung der Expressionsstärke der HEPA-1-6-Zellen und zur Überprüfung der Methode wurde zusätzlich eine vergleichende IP-Western-Blot-Analyse mit Leberlysaten einer transgenen Maus mit  *$\beta$ -actin*-Promotor-getriebener Expression von zytoplasmatischem EGFP durchgeführt (Hadjantonakis et al. 1998). Es wurden je ca. 25  $\mu$ g Gesamtprotein in die IP eingesetzt, anstelle der zuvor eingesetzten 600  $\mu$ g bei den *pTRANS*-Mäusen (vergl. Tab. 2). Im Gegensatz zu den *pTRANS*-Mäusen ist in den Leberlysaten der  *$\beta$ -actin-egfp*-Mäuse eine deutliche EGFP-Expression mit dieser Methode nachweisbar, die zudem weit stärker ist als in den transgenen HEPA-Zellen mit der transmembranären EGFP-Variante.



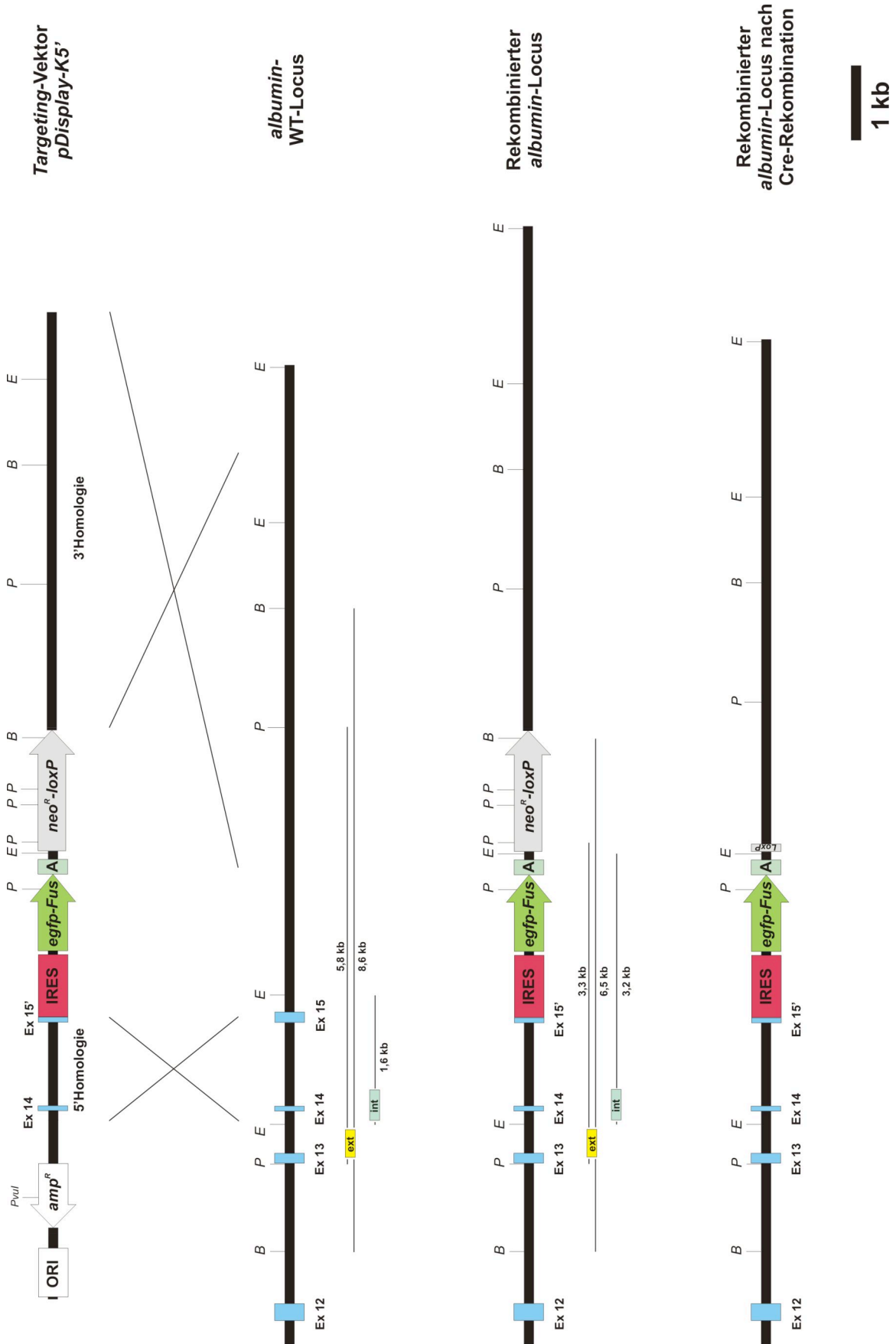
**Abb. 29: EGFP-IP-Western-Blot-Analyse von *pTRANS*-transgenen-HEPA-1-6 Zellen im Vergleich zu einem Gesamtleberlysate einer transgenen  *$\beta$ -actin-egfp*-Maus.** Die Expositionszeit betrug 5 min. Das EGFP-Fusionsprotein hat eine Größe von 38,3 kD, lösliches EGFP von 28 kD. kD: Protein-Molekulargewichts-Standard.

#### 4.5 Gene Targeting des *albumin*-Locus zur *albumin*-abhängigen Expression von transmembranärem EGFP

Als paralleler Ansatz zur Herstellung rekombinanter HM1-ES-Zellen mit *albumin*-abhängiger Expression von transmembranärem EGFP wurde ein *gene targeting* des *albumin*-Locus durchgeführt.

Bei der *gene targeting*-Strategie wird ein gewünschter Genabschnitt in embryonalen Stammzellen durch homologe Rekombination mit einem homologen Abschnitt des gleichen Gens und den zwischen den Homologiebereichen liegenden, fremden DNA-Abschnitten ausgetauscht. Dies wird durch *in-vitro*-Transfektion der ES-Zellen mit einem geeigneten *targeting*-Vektor erreicht. Da das Ereignis der homologen Rekombination sehr selten ist und zusätzlich noch in großer Konkurrenz zur heterologen Rekombination – der Integration des veränderten Genabschnittes an einem anderen als dem Genlocus – steht, werden zur Selektion homolog rekombinierter Klone Selektionsmarker verwendet. Ein häufig verwendeter, positiver Selektionsmarker zum Nachweis transfizierter Klone ist das *neomycin-phosphotransferase*-Gen (*NEO<sup>R</sup>*), das Resistenz gegenüber Neomycin oder Derivaten wie G418 verleiht. Das *neo<sup>R</sup>*-Gen wird häufig als *gfloxtes* Element, also umgeben von zwei *loxP*-sites im *targeting*-Vektor, verwendet. Dies eröffnete die Möglichkeit zur späteren Entfernung des *neo<sup>R</sup>*-Gens aus rekombinanten Klonen mit Hilfe der *Cre-Rekombinase*. Zu diesem Zweck können ausgewählte Klone mit einem *Cre-Rekombinase*-Expressionsvektor transfiziert werden. Optional können außerhalb der Homologiebereiche im *targeting*-Vektor negative Selektionsmarker eingebracht werden, die nur bei heterologer Rekombination in das Wirtsgenom integriert werden und in diesem Falle eine Wachstumshemmung oder gar ein Absterben der Zellen bewirken.

Das *egfp*-Fusionsgen sollte durch homologe Rekombination am Ende des natürlichen *albumin*-Gens in das ES-Zell-Genom integriert werden (Abb. 30), um in *albumin*-exprimierenden Zellen zusammen mit der *albumin*-mRNA in Form einer dicistronischen mRNA transkribiert zu werden. Die Translation der *egfp-message* sollte durch die *internal ribosomal entry site* (IRES) des humanen *NF- $\kappa$ B repressing factor* (*nrf*) (Oumard et al. 2000, Martinez-Salas et al. 2001, Hellen & Sarnow 2001) initiiert werden. Bei diesem IRES-Element handelt es sich um eine eukaryontisches Sequenzmotiv, das erfolgreich zur 5'Cap-unabhängigen Translationsinitiation eingesetzt wurde und dabei eine höhere Translationseffizienz als die etablierten viralen Sequenzen aus dem Poliovirus (Oumard et al. 2000), Hepatitis C Virus, dem Maul- und Klauenseuche Virus (FMDV) und Encephalomyocarditis Virus (EMCV) aufwies (Wang & Mukhtar 2002).

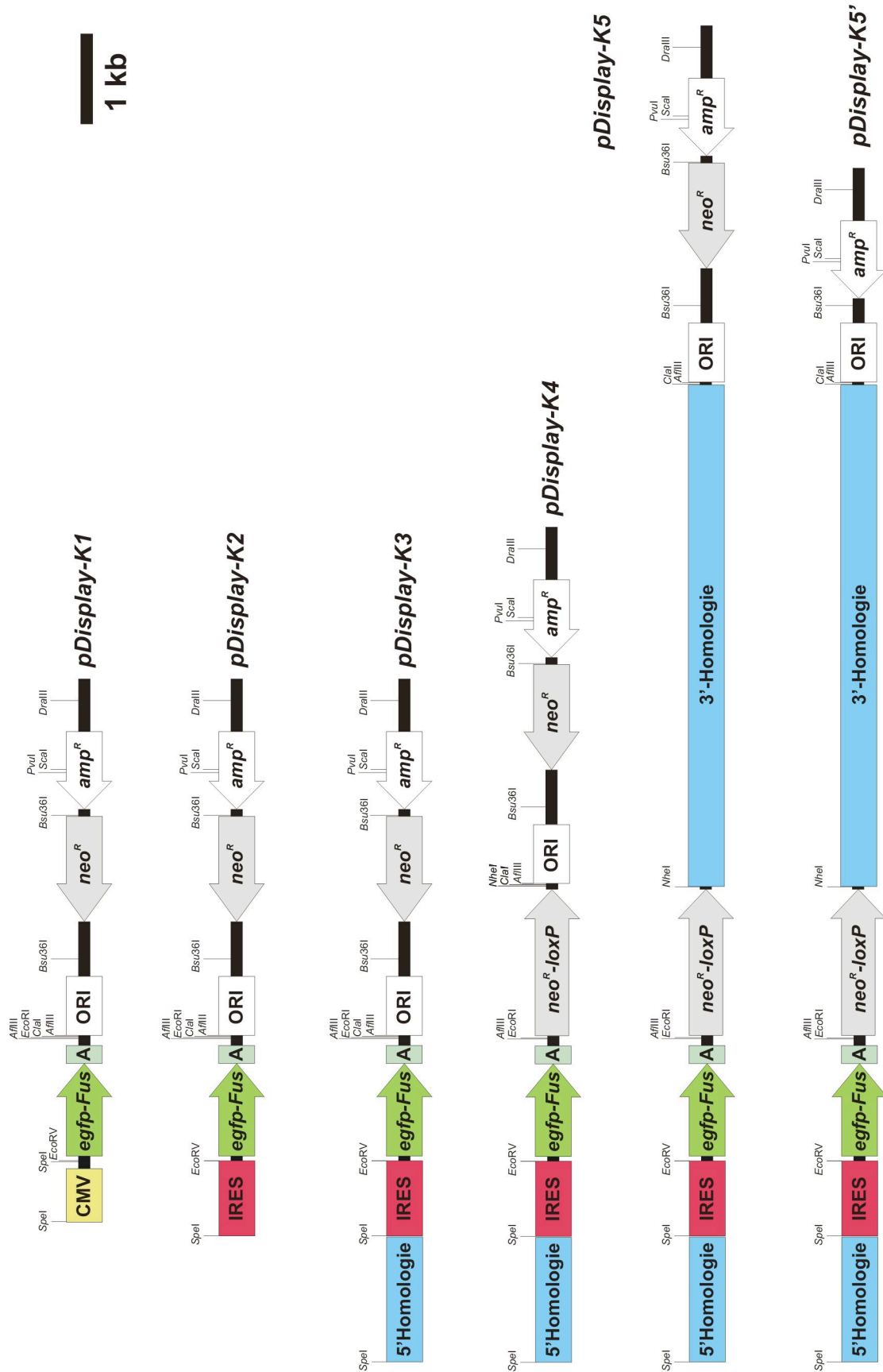


**Abb. 30: targeting des albumin-Locus mit dem targeting-Vektor pDisplay-K5'.** *egfp-Fus*: kodierende Sequenz des EGFP-Fusionsproteins, A: Poly-Adenylierungssignal, *amp<sup>R</sup>*: ampicillin-Resistenzgen, B: BamHI, E: EcoRI, ext: externe Sonde, int: interne Sonde, IRES: internal ribosomal entry site des *nrf*-Gens, *neo<sup>R</sup>-loxP*: gefloxtes Neomycin-Resistenzgen, P: PstI.

### 4.5.1 Klonierungsstrategie

Die Klonierung des *targeting*-Vektors *pDisplay-K5'* erforderte fünf aufeinander folgende Klonierungsschritte, um ausgehend von *pDisplay-egfp* nacheinander eine zusätzliche *multiple cloning site* (MCS) (*pDisplay-K1*), das *nrf*-IRES-Element (*pDisplay-K2*), den 5'-Homologiebereich (*pDisplay-K3*), das *gefloخته neo<sup>R</sup>*-Gen (*pDisplay-K4*) und den 3'-Homologiebereich einzuklonieren (*pDisplay-K5*), um schließlich das ursprünglich vorhandene *neo<sup>R</sup>*-Gen des *pDisplay*-Rückgrats zu entfernen (*pDisplay-K5'*). Die beiden Homologiebereiche und das IRES-Element wurden dabei aus genomischer HM1-DNA durch PCR gewonnen und für die Sequenzierung zunächst in *pGEM-T* kloniert. Die zusätzliche MCS wurde durch Klonierung eines kurzen doppelsträngigen DNA-*linker*-Moleküls erreicht. Das *neo<sup>R</sup>*-Gen wurde aus *pDisplay-NEOFLOX* ausgeschnitten.

Zur Herstellung von *pDisplay-K1* wurde *pDisplay-egfp* mit *AflIII* linearisiert und mit den doppelsträngigen Oligonukleotiden (hergestellt durch Hybridisierung von *P20-SK* und *P21-SK*), die kompatible Überhänge zur *AflIII* Schnittstelle hatten, ligiert. Das 470 bp große *nrf183*-IRES-Element (Wang & Mukhtar 2002) enthielt den Sequenzbereich von Position 183 bis 653 bezogen auf das 5'-Ende der *nrf*-mRNA und wurde aus humaner genomischer DNA amplifiziert. Die Klonierung in die *EcoRV* und die eine verbleibende *SpeI*-Schnittstelle von *pDisplay-K1* lieferte *pDisplay-K2*. Der bis dato vorhandene CMV-Promotor wurde durch diesen Klonierungsschritt (*SpeI*-Verdau) aus dem *targeting*-Vektor entfernt. Der 5'-Homologiebereich wurde mit 1388 bp als kurzer Homologiearm konzipiert, um die Möglichkeit einer PCR-Strategie zur Identifikation homolog rekombinierter ES-Zell-Klone zu ermöglichen. Er umfasste den Bereich von 125 bp vor Exon 14 bis einschließlich der ersten 72 bp des Exon 15 des *albumin*-Gens. Damit wurde das Stop-Codon der *albumin*-mRNA in Exon 14 erhalten, während das an Position 122 des Exon 15 beginnende Polyadenylierungssignal des *albumin*-Gens eliminiert wurde. Die Klonierung in *pDisplay-K2* erfolgte über die *SpeI*-Schnittstelle, die auch in den beiden Amplifikationsprimern für den 5'-Homologiebereich vorhanden waren und lieferte *pDisplay-K3*. Das *gefloخته neo<sup>R</sup>*-Gen konnte aus einem zuvor hergestellten Zwischenvektor *pDisplay-neo<sup>R</sup>-loxP* über *EcoRI* und *Clal* ausgeschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von *pDisplay-K3* kloniert werden (*pDisplay-K4*). Der 3'-Homologiebereich umfasste 5612 bp und entsprach dem Bereich 1889 bis 7500 bp stromabwärts des letzten Exons (Exon 15) des *albumin*-Gens. Über in den Amplifikationsprimern vorhandenen *NheI* und *Clal*-Schnittstellen wurde der 3'-Homologiebereich in *pDisplay-K4* einkloniert (*pDisplay-K5*). Durch Restriktion mit *Bsu36I* konnte das im Vektorrückgrat verbliebene, nicht gefloخته *neo<sup>R</sup>*-Gen ausgeschnitten werden, um nach Religation den fertigen *targeting*-Vektor *pDisplay-K5'* zu erhalten (Abb. 31).



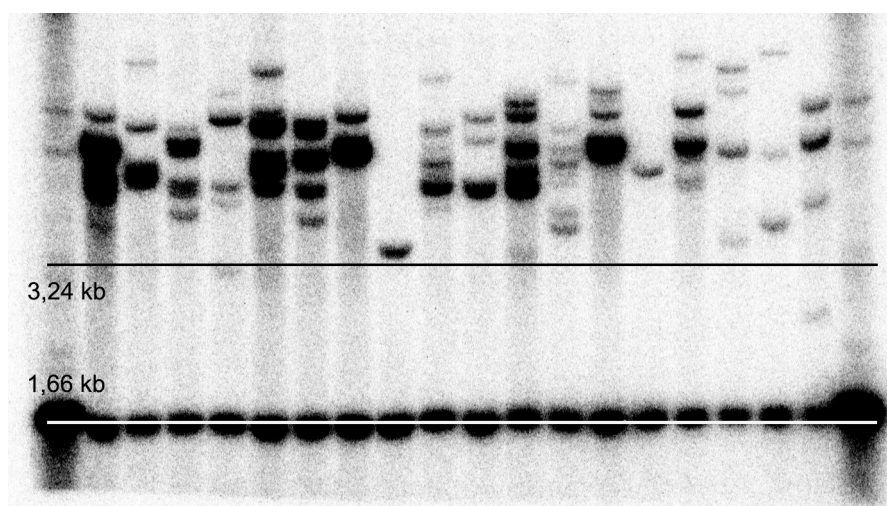
**Abb. 31: Klonierung des targeting-Vektors pDisplay-K5'.** CMV: CMV-Promotor, egfp-Fus: kodierende Sequenz des EGFP-Fusionsproteins, A: Poly-Adenylierungssignal, ORI: *origin of replication*, neo<sup>R</sup>: Neomycin-Resistenzgen, neo<sup>R</sup>-loxP: *gefloxtes neomycin-phosphotransferase-Gen*, amp<sup>R</sup>: *ampicillin-Resistenzgen*, IRES: *internal ribosomal entry site des nrf-Gens*.

#### 4.5.2 Herstellung und Analyse rekombinanter ES-Zell-Klone

Die Herstellung rekombinanter ES-Zell-Klone erfolgte durch Elektroporation von HM1-ES-Zellen. Der *targeting*-Vektor wurde dazu mit *PvuI* linearisiert und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt.

Nach neun- bis elftägiger Selektion mit G418 wurden insgesamt 647 resistente Klone expandiert und mittels Southern-Blot-Analyse auf homologe (und heterologe) Rekombinationsereignisse untersucht.

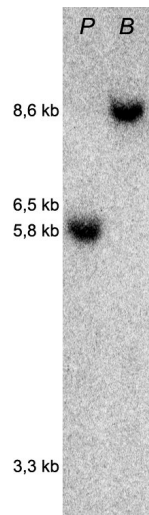
Als Sonde für die Southern-Hybridisierung wurde zunächst eine interne Sonde (5'-int) verwendet, die den ersten 491 bp des 5'-Homologiebereichs entspricht (Abb. 30). Im Southern-Blot war nach *EcoRI*-Verdau der ES-Zell-DNA das WT-Allel bei 1,663 kb zu erkennen, die rekombinante Bande wurde bei 3,236 kb erwartet (Abb. 32).



**Abb. 32: Southern-Hybridisierung von 54 HM1-*pDisplay-K5'*-transfizierten ES-Zellklonen (18 *pools* à 3 Klone) unter Verwendung der internen Southern-Sonde nach *EcoRI*-Restriktion. Die WT-Allel-Bande ist jeweils bei 1,66 kb zu erkennen. Die erwartete Größe eines potenziell rekombinanten Allels liegt bei 3,24 kb.**

Mit einer 462 bp großen externen Sonde (5'-ext), die homolog zum Bereich zwischen -534 bis -73 bp stromaufwärts der 5'-Homologie war, konnten aussichtsreiche Kandidaten weitergehend überprüft werden (Abb. 33). Die erwarteten Banden im Southern-Blot lagen für das WT- bzw. für das rekombinante Allel bei Verdau mit *PstI* bei 5,847 kb bzw. 3,291 kb und bei Verdau mit *BamHI* bei 8603 kb bzw. 6,480 kb.

Bei keinem der 647 G418-resistenten Klone konnte das erwartete homologe Rekombinationsereignis nachgewiesen werden. Auf die Herstellung und Untersuchung weiterer Klone wurde daraufhin verzichtet.



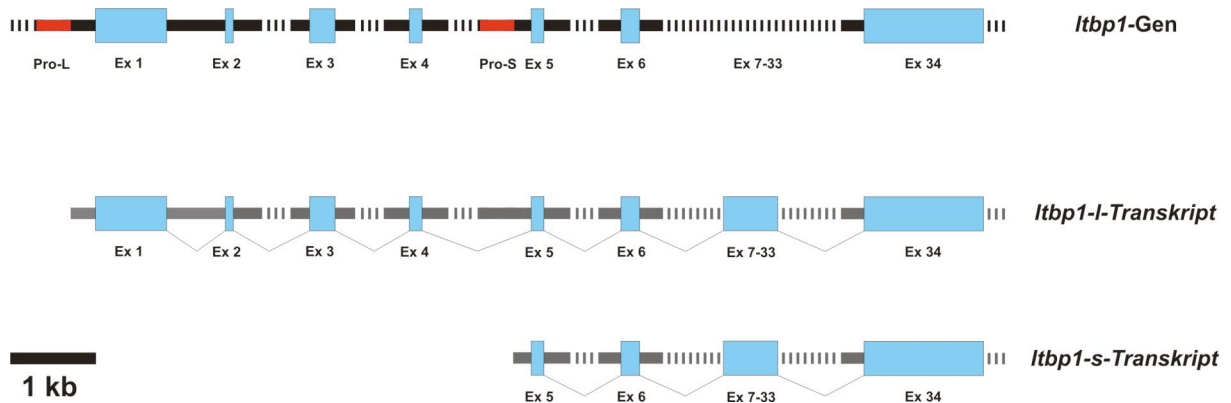
**Abb. 33: Southern-Hybridisierung eines Kandidatenklons unter Verwendung der externen Southern-Sonde.** *P*: *Pst*I-Restriktion und *B*: *Bam*HI-Restriktion eines HM1-Klons. Die WT-Allel-Bande ist jeweils bei 5,8 kb (*Pst*I) und 8,6 kb (*Bam*HI) zu erkennen. Die erwarteten Laufweite eines potenziell rekombinanten Allels sind eingezeichnet, konnten aber bei keinem Klon detektiert werden.



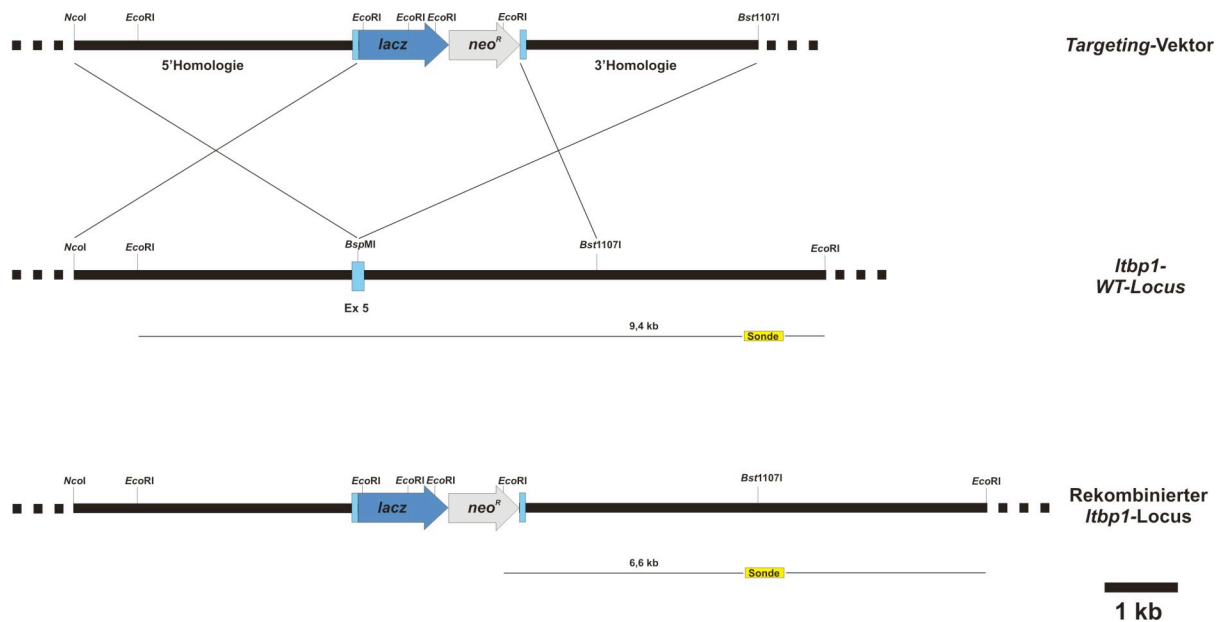
## B Analysen zur Rolle des *Itbp1*-Gens bei der Transdifferenzierung von HSC *in vitro* und *in vivo*.

Mithilfe einer *Itbp1*-KO-Maus, die freundlicherweise von Dr. Markus Moser (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde, sollte der Einfluss des *Itbp1* auf die Transdifferenzierung von HSC *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Zunächst musste die Maus näher charakterisiert werden, d.h. der funktionelle *knock out* des *Itbp1* nachgewiesen werden.

Das LTBP1-Protein existiert in 2 Varianten, einer kurzen Form, genannt LTBP1-S und einer langen Form, genannt LTBP1-L, deren Expression von zwei unterschiedliche Promotoren kontrolliert wird (Abb. 34). Zum *knock out* beider Genprodukte wurde eine Disruptionskassette in das fünfte Exon, das das erste gemeinsame Exon beider Transkriptionsvarianten ist, integriert (Abb. 35).



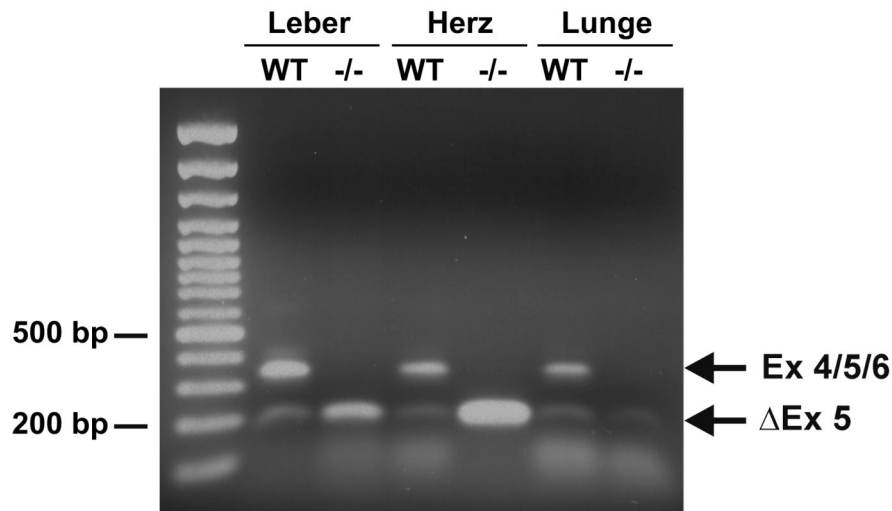
**Abb. 34: Struktur des *Itbp1*-Gens und der Transkriptvarianten *Itbp1-l* und *Itbp1-s*.** Die alternativen Promotoren (Weiskirchen et al. 2003, Noguera et al. 2003) des *Itbp1* vor Exon 1 bzw. 5 sind rot dargestellt (Pro-L und Pro S). Die Exons 7-33 sind in beiden Transkripten enthalten und der Übersichtlichkeit halber durch ein nicht maßstabsgetreues Exon (Ex7-33) symbolisiert.



**Abb. 35: Targeting-Strategie die zur Generierung der *Itbp1*-KO-Maus führte.** Die relevanten Schnittstellen die zur Herstellung des *targeting*-Konstrukts und für die Southern-Blot-Strategie genutzt wurden sind eingezeichnet.

#### 4.6 Identifikation von *Itbp1*-Transkript-Varianten

Durch die Integration der *gene-targeting*-Kassette in Exon 5 des *Itbp1*-Gens war das erste Exon des *Itbp1*-S ausgetauscht worden und konnte nicht mehr transkribiert werden. Um zu überprüfen, ob auch die *Itbp1*-L-Variante auf mRNA-Ebene in Folge des *knock-in* ausblieb, wurden RT-PCR-Analysen mit Exon-überspannenden Primern, die zu Bereichen in Exon 4 und 6 komplementär sind, durchgeführt (Abb. 36). Untersucht wurden Herz-, Leber- und Lungen-Proben. In den WT-Proben war das erwartete 349 bp große Amplifikat zu erkennen, das in den KO-Proben fehlt. Allerdings waren in allen WT- und KO-Proben verkürzte Amplifikate zu beobachten. Die folgende Klonierung und Sequenzierung ergab, dass es sich dabei um eine Spleissvariante des *Itbp1* handelte, bei der das Exon 4 - unter Umgehung des Exon 5 - an das Exon 6 fusioniert ist, ähnlich der  $\Delta 55$ -Form, die im Menschen bekannt ist (Oklü et al. 1998a). Theoretisch führt diese Spleissvariante zu einem um 56 Aminosäuren verkürztes LTBP1-L-Protein, dessen Existenz jedoch bis dato in keiner Spezies nachgewiesen werden konnte.



**Abb. 36: RT-PCR-Nachweis von *Itbp1*-Transkriptvarianten in verschiedenen Maus-Geweben.** Das erwartete WT-Amplifikat der Exons 4-6 mit den Primern *Itbp1 ex4 for.* und *Itbp1 ex6 rev.* ist 349 bp groß. Zusätzlich sind bei allen Proben verkürzte Amplifikate (179 bp), die durch alternatives Spleissen entstehen, zu erkennen.

#### 4.7 Analyse des Transdifferenzierungspotentials von WT und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-HSC *in vitro*

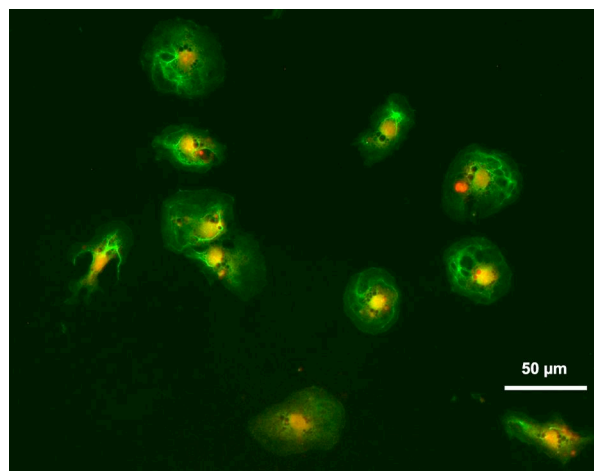
*in-vitro*-Transdifferenzierung ist ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der HSC-Aktivierung. HSC, die auf Plastik kultiviert werden, durchlaufen Veränderungen, die den Prozess der Transdifferenzierung oder Aktivierung rekapitulieren, der *in vivo* stattfindet. Das Resultat sind homogene Kulturen MFB-artiger Zellen die einfach subkultiviert und analysiert werden können (Friedman 1999, Friedman 1993, Gressner 1994).

Zur Analyse des Transdifferenzierungspotentials von wt- und *Itbp1*-defizienten HSC wurden zunächst vergleichende microarraybasierte Genexpressions-Analysen durchgeführt. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Welche Transkripte sind für den ruhenden und den *in vitro* Aktivierung Phänotyp der HSC kennzeichnend?
2. Wie unterscheidet sich die Genexpression in WT- und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-HSC in Bezug auf Aktivierungs-relevante Gene?
3. Lässt sich aufgrund der Genexpressions-Analyse eine Prognose zum fibrogenen Potential *Itbp1*-defizienter Mäuse ableiten?

#### 4.7.1 Validierung der HSC-Zellpräparation durch Immunfluoreszenz

Die HSC-Präparationen aus WT- und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen erfolgten durch *in-situ*-Perfusion und anschließende Dichtegradientenzentrifugation. Zur Validierung der Reinheit der verwendeten Zellpräparationen wurden Aliquots der Zellpräparation durch Immunfluoreszenz-Färbungen mit dem HSC-spezifischen Marker GFAP gefärbt (Olaso et al. 2003). GFAP wird in der Mausleber ausschließlich von nativen, nicht-aktivierten HSC exprimiert. Zur Etablierung der Immunfärbungen dienten Leber-Kryoschnitte von WT-Mäusen (nicht gezeigt). Verschiedene Zellpräparationen wiesen nach eintägiger Kultivierung auf Plastikobjektträgern (*chamber slides*, Lab-Tek®) zwischen 65% und 70% GFAP exprimierende Zellen auf (Abb. 37).



**Abb. 37: Immunfluoreszenz-Aufnahme einer WT-HSC-Präparation.** GFAP wurde mit FITC (grün), Zellkerne mit PI (orange) gefärbt. Zehn GFAP-positive und eine GFAP-negative (unten Mitte) Zelle sind zu erkennen.

#### 4.7.2 Genexpressions-Analysen

Vergleichende Genexpressions-Analysen erfolgten mit PIQOR™ Immunology Microarrays (Miltenyi Biotec). Nach Präparation und Qualitätskontrolle von Gesamt-RNA wurde diese amplifiziert (T7-Amplifikation, nach Eberwine, 1996) und je 1 µg für die Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNAs eingesetzt. Die Cy3-markierte cDNA der jeweils ersten Probe wurde dazu mit der Cy5-markierten cDNA der jeweils zweiten Probe vereint und auf dem PIQOR™ Immunology Microarray (Miltenyi Biotec) hybridisiert. Die Versuche wurden jeweils als technische Replikate durchgeführt. Zunächst wurden Kontroll-Hybridisierungen mit einer unabhängig voneinander amplifizierten und fluoreszenzmarkierten WT-Fibroblasten-RNA-Präparation durchgeführt. Die Hybridisierung diente zur Festlegung des System-bedingten Auflösungsvermögens von Expressionsunterschieden. Der maximale Expressionsunterschied lag, bei Verwendung der gleichen Ausgangs-RNA, bei 1,29-fach. Bei 99,99% der detektierten Gene waren der Expressionsunterschied weniger als einen

1,2-fach (nicht gezeigt). Für die Folgeexperimente wurde daher Gene, die ein Expressionsunterschied von 1,5-fach aufwiesen, als differentiell reguliert angesehen. Der durchschnittliche Variationskoeffizient (CV) der jeweils 4 gemessenen Replikate pro Gen lag bei 2,59% und bewies die Reproduzierbarkeit des Systems (nicht gezeigt). Die Rohdaten und prozessierten Daten aller Einzelexperimente wurden gemeinsam mit einer detaillierten Beschreibung der Experiment-Serie in der NCBI-Datenbank GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) hinterlegt und sind unter der Zugriffsnummer GSE5670 abrufbar.

#### **4.7.2.1 Differentielle Genexpression von aktivierten und ruhenden HSC *in vitro***

Zum Vergleich der differentiellen Genexpression von ruhenden und aktivierten (transdifferenzierten) HSC wurden Zellen von je fünf WT-Tieren entweder für einen Tag (ruhende HSC) bzw. für sechs Tage (aktivierte HSC) *in vitro* kultiviert und anschließend analysiert.

Aktivierte und ruhende HSC wiesen extreme Expressionsunterschiede auf (Abb. 38). Von den 1070 Genen auf dem Microarray lieferten 1062 ein detektierbares Signal und 460 dieser Gene waren differentiell reguliert. 266 Gene (57,8%) der regulierten Gene unterschieden sich dabei mindestens um einen Faktor 2 und 108 (23,5%) mindestens um einen Faktor 4. Wie es aufgrund der harschen Isolierungsmethode zu erwarten ist, stehen einige der in den ruhenden HSC stärker exprimierten Gene in Verbindung mit zellulären Stressantworten – so z.B. *hspa1b/1a*, das am stärksten von allen Genen reguliert war, sowie *hsp105*, Interferon-aktivierte Gene und etliche Gene für Komponenten des Komplement-Systems (Tab. 3). Unter den Genen die in den nicht-aktivierten HSC stärker exprimiert waren als in aktivierten, waren bekannte HSC-Marker wie LRAT (Matsuura et al. 1999), das Enzym, das die Veresterung von Retinol katalysiert und somit zur Bildung der charakteristischen Vitamin-A-Tröpfchen beiträgt, CD36 (Fettsäure-Translokase) (Hellemans et al. 2003), die Proteoglycane Decorin und Lumican (Gressner et al. 1994) sowie die nicht-fibrilläre Kollagen-Typ-VI-alpha-Kette (Gressner & Bachem 1990, Gressner & Bachem 1995), HGF (Ramadori et al. 1992), FCGR1 (Fc-Rezeptor) und CD74 (MHC-Klasse-II-Komplex, invariante Kette). Letztere beiden spiegeln die Antigen-präsentierende Natur der HSCs wider (Winau et al. 2006).

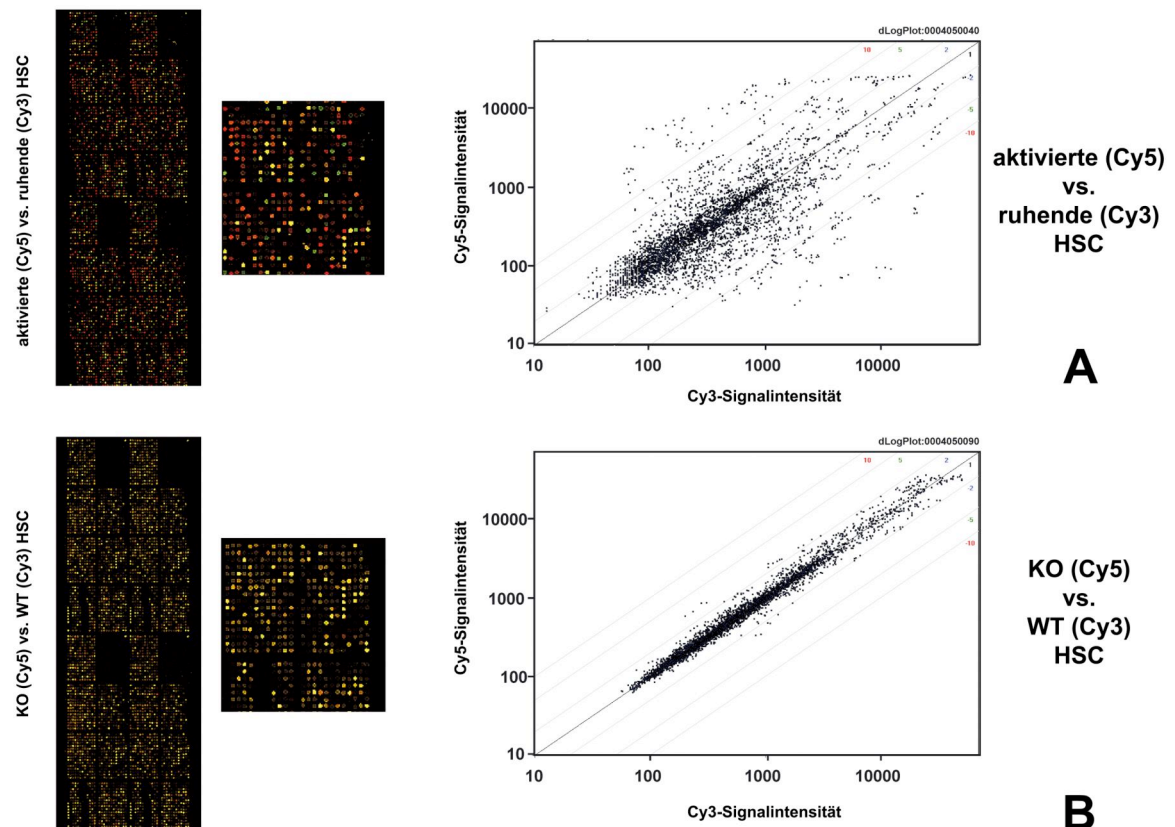
Das Bild für die Gene, die in den aktivierten HSC stärker exprimiert sind als in den ruhenden, ist noch klarer (Tab. 4): bekannte Marker wie ACTA2 (*smooth muscle actin*), SPP1 (Osteopontin) (Kawashima et al. 1999) und viele Gene die im Zusammenhang mit der Synthese und Degradation der ECM stehen, sind im Vergleich zu den nicht-aktivierten Zellen stärker exprimiert, unter anderen MMP-3 (Knittel et al. 1999, Vyas et al. 1995), MMP-9 (Lee et al. 2003), MMP-10, MMP-13 (Lee et al. 2003, Iredale et al. 1995, Milani et al. 1994),

Serpine1 (PAI-1) (Tahashi et al. 2002), Serpinb2 (PAI-2) (Knittel et al. 1999, Benyon & Arthur 2001), Serpinh1, TIMP-1 (Benyon & Arthur 2001), TIMP-2 (Herbst et al. 1997), TIMP-3, THBS1, THBS3, fibrilläres COL1A1 (Garcia-Trevijano et al. 1999) und Fibulin-2 (Ramadori & Saile 2002, Tateaki et al. 2004). CD9 und CD81, die Mitglieder der Tetraspanin-Familie sind stehen in Verbindung mit der Motilität aktivierter HSC (Mazzocca et al. 2002). TM4SF1, das in diesem Zusammenhang jedoch noch nicht beschrieben ist und das proinflammatorische Zytokin IL-6 (Ramadori & Saile 2002) waren in den aktivierten Zellen stärker exprimiert.

#### **4.7.2.2 Differentielle Genexpression in WT- und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-HSC nach *in-vitro*-Aktivierung**

Zum Vergleich der aktivierten WT- und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-HSC wurden die Zellen von jeweils fünf männlichen Tieren jeweils für 6 Tage *in vitro* kultiviert. Im Gegensatz zu der vorangegangenen Analyse, die zur Identifizierung Transdifferenzierungs-relevanter Gene diente, waren die gemessenen Expressionsunterschiede zwischen aktivierten WT- und KO-HSC gering (Abb. 38). 849 Gene wurden auf allen drei Arrays detektiert. Davon zeigten nur 40 Gene eine differentielle Expression, d.h. ein durchschnittliches Expressionsverhältnis größer 1,5 (Tab. 5). Nur 6 Gene wiesen Expressionsveränderungen von mehr als zweifach auf – der höchste Wert wurde für das Gen *Irat*, mit einer (-)3,39-fach stärkeren Präsenz in *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Zellen, bestimmt. Wie aufgrund der RT-PCR-Analyse zu erwarten war, waren auch in den KO-Zellen Transkripte des *Itbp1* detektierbar, wenn auch 2,61-fach schwächer als im WT.

Zur genauen Klassifizierung der geringen Expressionsunterschiede zwischen den WT und *Itbp1*<sup>-/-</sup> HSC und zur Beurteilung des Transdifferenzierungsgrades wurden daher die Ergebnisse der Hybridisierung von aktivierten gegen ruhende HSC herangezogen.



**Abb. 38: Microarray-Analyse.** Repräsentative Microarray-Bilder (links) und Doppel-log-Scatterplots (rechts) der Microarray-Analysen die zum Vergleich der ruhenden (Cy3) und aktivierten (Cy5) WT-HSC (A) und der aktivierten WT (Cy3) und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-defizienten (Cy5) HSC dienen. In den Scatterplots sind die Signalintensitäten alle detektierten *spots*/Gene, die die Qualitätskontrolle passiert haben durch einen Punkt dargestellt. X-Achse: Cy3-Signalintensität, Y-Achse: Cy5-Signalintensität. Die gepunkteten Diagonalen definieren die Bereiche X-facher differentieller Signalintensitäten.

Obwohl die quantitativen Expressionsunterschiede zwischen den transdifferenzierten WT und *Itbp1*<sup>-/-</sup> HSC eher gering waren, konnten - mit Hilfe des „Transdifferenzierungs-Datensatzes“ (WT1d/WT6d) als Referenz - die *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Zellen als weniger stark transdifferenziert klassifiziert werden (Tab. 5). 10 von 11 (*Itbp1* ausgenommen) relativ stärker exprimierte Gene in den WT-Zellen sind mit dem aktivierten Phänotyp assoziiert, während 20 von 28 regulierten Genen, die in den *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Zellen stärker exprimiert waren, kennzeichnend für den nicht-aktivierten Zustand sind. *Itbp1* wurde, wie zu erwarten im WT ebenfalls stärker exprimiert.

PTGS2, TMF4SF1, MMP-10, MMP-13 und THBD, die alle Marker für den aktivierten Zustand sind, waren ebenfalls unter den Genen, die im WT stärker exprimiert waren als im *knock out*. Starke Marker für den undifferenzierten Phänotyp wie EGR1, HGF, COL6A1 und LUMICAN waren - stärker exprimiert - ausschließlich bei den *Itbp1*-defizienten und nicht bei den WT-Zellen zu finden.

---

Diese Resultate implizieren, dass das Ausschalten des *ltbp1*-Gens unter den experimentellen Bedingungen der *in-vitro*-Transdifferenzierung zu einer leichten Verzögerung bzw. Abschwächung der Transdifferenzierung führt. Bemerkenswert ist zudem, dass keine der LTBP- und TGF- $\beta$ -Isoformen und -Rezeptoren, die analysiert wurden, eine differentielle Expression in Abhängigkeit vom *ltbp1-knock out* zeigten (Tab. 6).



**Tab. 3: Am stärksten hochregulierte Gene in ruhenden HSC im Vergleich zu aktivierten HSC.** Verhältnisse <1 sind als negativ reziproke Werte angegeben. VarK: Variationskoeffizient der detektierten und berechneten Replikate des Gens pro Array. Die verwendeten laufenden Arraynummer (40, 42) sind angegeben. MW: Mittelwert der Expressionsverhältnisse (Auf Angabe einer Standardabweichung wurde verzichtet, da n<3).

Gene-Symbol	GenBank-Acc.No.	Gen-Name	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC Array 40	VarK 40	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC Array 42	VarK 42	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC MW 40, 42
<b>hspa1b</b>	nm_010479	<i>heat shock protein 1b</i>	-279,95	15%	-223,70	10%	<b>-248,69</b>
<b>hspa1a</b>	nm010478	<i>heat shock protein 1a</i>					
<b>tgfb1</b>	nm_009369	<i>transforming growth factor, beta induced</i>	-117,35	17%	-100,00	5%	<b>-107,98</b>
<b>ltbp4</b>	nm_175641	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 4</i>	-50,00	11%	-50,00	12%	<b>-50,00</b>
<b>c1qa</b>	nm_007572	<i>complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide</i>	-50,00	25%	-33,33	38%	<b>-40,00</b>
<b>irf1</b>	nm_008390	<i>interferon regulatory factor 1</i>	-33,33	8%	-33,33	3%	<b>-33,33</b>
<b>jun</b>	nm_010591	<i>jun oncogene</i>	-25,00	1%	-25,00	5%	<b>-25,00</b>
<b>sparc11</b>	nm_010097	<i>sparc-like 1 (mast9, hevin)</i>	-20,00	8%	-20,00	6%	<b>-20,00</b>
<b>irf7</b>	nm_016850	<i>interferon regulatory factor 7</i>	-20,00	5%	-16,67	7%	<b>-18,18</b>
<b>darcs</b>	nm_010045	<i>duffy blood group</i>	-16,67	4%	-16,67	24%	<b>-16,67</b>
<b>lrat</b>	nm_023624	<i>lecithin-retinol acyltransferase (phosphatidyl-choline-retinol-o-acyltransferase)</i>	-20,00	5%	-14,29	6%	<b>-16,67</b>
<b>cxcl10</b>	nm_021274	<i>chemokine (c-x-c motif) ligand 10</i>	-12,50	4%	-14,29	7%	<b>-13,33</b>
<b>spry1</b>	nm_011896	<i>sprouty homolog 1 (drosophila)</i>	-12,50	2%	-11,11	3%	<b>-11,76</b>
<b>atf3</b>	nm_007498	<i>activating transcription factor 3</i>	-11,11	8%	-12,50	14%	<b>-11,76</b>
<b>icam1</b>	nm_010493	<i>intercellular adhesion molecule</i>	-11,11	3%	-11,11	10%	<b>-11,11</b>
<b>csf1r</b>	nm_007779	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>	-11,11	11%	-11,11	18%	<b>-11,11</b>
<b>myd116</b>	nm_008654	<i>myeloid differentiation primary response gene 116</i>	-11,11	14%	-11,11	9%	<b>-11,11</b>
<b>mapt</b>	nm_010838	<i>microtubule-associated protein tau</i>	-9,09	6%	-14,29	3%	<b>-11,11</b>
<b>bmp2</b>	nm_007553	<i>bone morphogenetic protein 2</i>	-12,50	14%	-10,00	7%	<b>-11,11</b>
<b>dcn</b>	nm_007833	<i>decorin</i>	-10,00	4%	-11,11	2%	<b>-10,53</b>
<b>map3k8</b>	nm_007746	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase 8</i>	-11,11	5%	-10,00	4%	<b>-10,53</b>
<b>lum</b>	nm_008524	<i>lumican</i>	-10,00	6%	-10,00	3%	<b>-10,00</b>
<b>tlr2</b>	nm_011905	<i>toll-like receptor 2</i>	-10,00	9%	-9,09	8%	<b>-9,52</b>
<b>hck</b>	nm_010407	<i>hemopoietic cell kinase</i>	-11,11	7%	-7,69	17%	<b>-9,09</b>
<b>c4b;c4a</b>	nm_009780	<i>complement component 4a + b</i>	-8,33	47%	-10,00	31%	<b>-9,09</b>
<b>c1s</b>	nm_144938	<i>complement component 1, s subcomponent</i>	-9,09	13%	-8,33	5%	<b>-8,70</b>
<b>egr1</b>	nm_007913	<i>early growth response 1</i>	-10,00	6%	-7,69	15%	<b>-8,70</b>
<b>ccl4</b>	nm_013652	<i>chemokine (c-c motif) ligand 4</i>	-10,00	21%	-7,69	26%	<b>-8,70</b>
<b>gem</b>	nm_010276	<i>gtp binding protein</i>	-11,11	8%	-6,67	13%	<b>-8,33</b>
<b>sorbs1</b>	nm_009166	<i>sorbin and sh3 domain containing 1</i>	-7,14	12%	-7,14	10%	<b>-7,14</b>
<b>emr1</b>	nm_010130	<i>egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1</i>	-7,14	11%	-6,67	14%	<b>-6,90</b>
<b>ccl2</b>	nm_011333	<i>chemokine (c-c motif) ligand 2</i>	-6,67	3%	-6,67	3%	<b>-6,67</b>
<b>selenbp1</b>	nm_019414	<i>selenium binding protein 2</i>	-6,25	7%	-6,67	3%	<b>-6,45</b>
<b>selenbp2</b>	nm_009150	<i>selenium binding protein 1</i>					
<b>c2</b>	nm_013484	<i>complement component 2 (within h-2s)</i>	-7,14	3%	-5,88	18%	<b>-6,45</b>
<b>socs1</b>	nm_009896	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>	-6,67	9%	-5,56	8%	<b>-6,06</b>
<b>irf5</b>	nm_012057	<i>interferon regulatory factor 5</i>	-6,67	6%	-5,56	6%	<b>-6,06</b>
<b>tnfsf9</b>	nm_009404	<i>tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9</i>	-6,25	3%	-5,56	9%	<b>-5,88</b>
<b>nfkbia</b>	nm_010907	<i>nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in b-cells inhibitor, alpha</i>	-5,88	2%	-5,88	5%	<b>-5,88</b>
<b>ncoa1</b>	nm_010881	<i>nuclear receptor coactivator 1</i>	-5,88	3%	-5,56	10%	<b>-5,71</b>

Tab. 3: Fortsetzung: Am stärksten hochregulierte Gene in ruhenden HSC im Vergleich zu aktivierten HSC. Beschriftung siehe vorherige Seite.

Gene-Symbol	GenBank-Acc.No.	Gen-Name	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC Array 40	VarK 40	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC Array 42	VarK 42	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC MW 40, 42
<b>cd36</b>	nm_007643	<i>CD36 antigen</i>	-5,56	3%	-5,88	10%	<b>-5,71</b>
<b>prkcb1</b>	nm_008855	<i>protein kinase c, beta 1</i>	-5,56	12%	-5,26	21%	<b>-5,41</b>
<b>plekhc1</b>	nm_146054	<i>pleckstrin homology domain containing, family c (with ferm domain) member 1</i>	-5,26	10%	-5,56	18%	<b>-5,41</b>
<b>cxcl9</b>	nm_008599	<i>chemokine (c-x-c motif) ligand 9</i>	-5,26	4%	-5,00	4%	<b>-5,13</b>
<b>rgs1</b>	nm_015811	<i>regulator of g-protein signaling 1</i>	-5,56	5%	-4,76	2%	<b>-5,13</b>
<b>fcgr1</b>	nm_010186	<i>fc receptor, igg, high affinity i</i>	-4,76	9%	-5,00	16%	<b>-4,88</b>
<b>hsp110</b>	nm_013559	<i>heat shock protein 110</i>	-5,00	30%	-4,76	12%	<b>-4,88</b>
<b>bcl2a1a</b>	nm_009742	<i>b-cell leukemia/lymphoma 2 related protein a1a</i>	-5,56	9%	-4,35	19%	<b>-4,88</b>
<b>cd82</b>	nm_007656	<i>CD82 antigen</i>	-4,55	2%	-5,00	3%	<b>-4,76</b>
<b>fosb</b>	nm_008036	<i>fbj osteosarcoma oncogene b</i>	-4,76	7%	-4,76	26%	<b>-4,76</b>
<b>col6a1</b>	nm_009933	<i>procollagen, type vi, alpha 1</i>	-4,76	2%	-4,55	4%	<b>-4,65</b>
<b>col16a1</b>	nm_028266	<i>procollagen, type xvi, alpha 1</i>	-4,55	8%	-4,76	9%	<b>-4,65</b>
<b>sos2</b>	xm_916574	<i>son of sevenless homolog 2 (drosophila)</i>	-4,55	7%	-4,76	4%	<b>-4,65</b>
<b>cxcl12</b>	nm_021704	<i>chemokine (c-x-c motif) ligand 12</i>	-4,35	4%	-5,00	5%	<b>-4,65</b>

**Tab. 4: Am stärksten hochregulierte Gene in aktivierten HSC im Vergleich zu ruhenden HSC.** VarK: Variationskoeffizient der detektierten und berechneten Replikate des Gens pro Array. Die verwendeten laufenden Arraynummer (40, 42) sind angegeben. MW: Mittelwert der Expressionsverhältnisse (Auf Angabe einer Standardabweichung wurde verzichtet, da  $n < 3$ ).

Gene-Symbol	GenBank-Acc.No.	Gen-Name	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC Array 40	VarK 40	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC Array 42	VarK 42	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC MW 40, 42
<i>mmp3</i>	nm_010809	<i>matrix metalloproteinase 3</i>	49,55	18%	44,96	8%	<b>47,26</b>
<i>mmp13</i>	nm_008607	<i>matrix metalloproteinase 13</i>	40,28	9%	38,36	25%	<b>39,32</b>
<i>spp1</i>	nm_009263	<i>secreted phosphoprotein 1</i>	32,58	31%	32,43	17%	<b>32,51</b>
<i>timp1</i>	nm_011593	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>	24,79	3%	24,8	2%	<b>24,80</b>
<i>lcn2</i>	nm_008491	<i>lipocalin 2</i>	25,09	7%	19,85	9%	<b>22,47</b>
<i>fbln2</i>	nm_007992	<i>fibulin 2</i>	20,07	4%	21,48	8%	<b>20,78</b>
<i>thbd</i>	nm_009378	<i>thrombomodulin</i>	25,04	27%	15,37	35%	<b>20,21</b>
<i>tm4sf1</i>	nm_008536	<i>transmembrane 4 superfamily member 1</i>	20,73	12%	19,29	3%	<b>20,01</b>
<i>mmp10</i>	nm_019471	<i>matrix metalloproteinase 10</i>	23,28	29%	15,59	39%	<b>19,44</b>
<i>thbs1</i>	nm_011580	<i>thrombospondin 1</i>	18,96	5%	18,55	5%	<b>18,76</b>
<i>acta2</i>	nm_007392	<i>actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>	7,48	13%	26,85	24%	<b>17,17</b>
<i>ptgs2</i>	nm_011198	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	15,72	11%	14,12	9%	<b>14,92</b>
<i>col5a2</i>	nm_007737	<i>procollagen, type v, alpha 2</i>	15,02	4%	14,49	4%	<b>14,76</b>
<i>cd24a</i>	nm_009846	<i>CD24a antigen</i>	14,11	22%	9,93	13%	<b>12,02</b>
<i>ctgf</i>	nm_010217	<i>connective tissue growth factor</i>	13,2	6%	10,41	4%	<b>11,81</b>
<i>fstl1</i>	nm_008047	<i>folliculin-like 1</i>	11,75	4%	9,68	5%	<b>10,72</b>
<i>inhba</i>	nm_008380	<i>inhibin beta-a</i>	9,54	20%	8,73	14%	<b>9,14</b>
<i>col8a1</i>	nm_007739	<i>procollagen, type viii, alpha 1</i>	7,69	8%	8,36	19%	<b>8,03</b>
<i>col7a1</i>	nm_007738	<i>procollagen, type vii, alpha 1</i>	7,27	20%	8,37	11%	<b>7,82</b>
<i>serpinb2</i>	nm_011111	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade b, member 2</i>	6,34	5%	7,81	24%	7,08
<i>stmn1</i>	nm_019641	<i>stathmin 1</i>	6,78	10%	7,36	7%	<b>7,07</b>
<i>pmp22</i>	nm_008885	<i>peripheral myelin protein</i>	6,14	7%	7,13	4%	<b>6,64</b>
<i>pgf</i>	nm_008827	<i>placental growth factor</i>	4,47	39%	8,16	5%	<b>6,32</b>
<i>ltb4dh</i>	nm_025968	<i>leukotriene b4 12-hydroxydehydrogenase</i>	5,97	13%	6,33	6%	<b>6,15</b>
<i>timp3</i>	nm_011595	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>	6,18	4%	5,96	3%	<b>6,07</b>
<i>tnc</i>	nm_011607	<i>tenascin c</i>	5,3	35%	6,76	5%	<b>6,03</b>
<i>hmox1</i>	nm_010442	<i>heme oxygenase (decycling) 1</i>	5,28	24%	6,13	13%	<b>5,71</b>
<i>il6</i>	nm_031168	<i>interleukin 6</i>	5,51	34%	5,38	3%	<b>5,45</b>
<i>cd9</i>	nm_007657	<i>CD9 antigen</i>	5,23	8%	5,31	6%	<b>5,27</b>
<i>bax</i>	nm_007527	<i>bcl2-associated x protein</i>	4,91	3%	5,25	5%	<b>5,08</b>
<i>procr</i>	nm_011171	<i>protein c receptor, endothelial</i>	5,08	18%	5,08	10%	<b>5,08</b>
<i>serpinh1</i>	nm_009825	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade h, member 1</i>	5,17	8%	4,86	2%	<b>5,02</b>
<i>p2ry14</i>	nm_133200	<i>purinergic receptor p2y, g-protein coupled, 14</i>	4,98	2%	4,89	7%	<b>4,94</b>
<i>itga5</i>	nm_010577	<i>integrin alpha 5 (fibronectin receptor alpha)</i>	4,71	26%	5,14	19%	<b>4,93</b>
<i>tubb5</i>	nm_011655	<i>tubulin, beta 5</i>	4,86	5%	4,92	5%	<b>4,89</b>
<i>foxk2</i>	xm_126489	<i>forkhead box k2</i>	1,36	13%	8,18	139%	<b>4,77</b>
<i>mgst1</i>	nm_019946	<i>microsomal glutathione s-transferase 1</i>	4,21	21%	4,83	12%	<b>4,52</b>
<i>cd44</i>	nm_009851	<i>CD44 antigen</i>	4,41	18%	4,56	6%	<b>4,49</b>
<i>mapk6</i>	nm_015806	<i>mitogen-activated protein kinase 6</i>	4,85	10%	4,12	4%	<b>4,49</b>
<i>col1a1</i>	nm_007742	<i>procollagen, type i, alpha 1</i>	4,55	6%	4,25	5%	<b>4,40</b>

**Tab. 5: Klassifizierung von hoch- und herunterregulierten Gene in aktivierten WT- und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-HSC.** Verhältnisse <1 sind als negativ reziproke Werte angegeben. Für die Experimente HSC WT / *Itbp1*<sup>-/-</sup> ist ein Mittelwert aus drei technischen Replikaten der Arrays 85, 90 und 33 mit Standardabweichung ( $\delta$ ) angegeben (Einzeldaten der Arrays siehe Anhang). Die Klassifizierung eines Gens als Marker für aktivierte (AKT) oder ruhende (R) HSC erfolgte mit dem dem Referenzdatenatz: aktivierte/ruhende HSC (Schwellenwert (+) / (-)-1,5-fach.

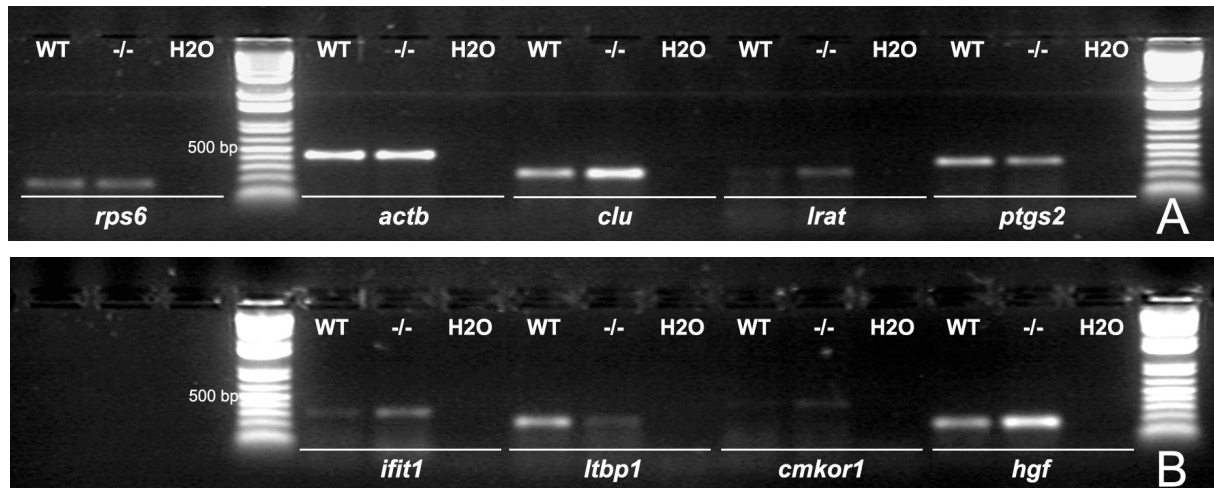
Gene-Symbol	GenBank-Acc.No.	Gen-Name	Verhältnis aktivierte HSC: WT / <i>Itbp1</i> <sup>-/-</sup> MW 85, 90, 33	$\delta$	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC MW 40, 42	Marker für aktivierte / ruhende HSC
<i>Itbp1</i>	nm_019919	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	2,61	0,09	1,89	KO/AKT
<i>ptgs2</i>	nm_011198	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>	1,99	0,03	14,92	AKT
<i>tm4sf1</i>	nm_008536	<i>transmembrane 4 superfamily member 1</i>	1,86	0,01	20,01	AKT
<i>mmp13</i>	nm_008607	<i>matrix metalloproteinase 13</i>	1,83	0,03	39,32	AKT
<i>f3</i>	nm_010171	<i>coagulation factor iii</i>	1,81	0,09	1,58	AKT
<i>mmp10</i>	nm_019471	<i>matrix metalloproteinase 10</i>	1,76	0,03	19,44	AKT
<i>thbd</i>	nm_009378	<i>thrombomodulin</i>	1,74	0,03	20,21	AKT
<i>plaur</i>	nm_011113	<i>plasminogen activator, urokinase receptor</i>	1,61	0,03	1,48	-
<i>thbs3</i>	nm_013691	<i>thrombospondin 3</i>	1,58	0,02	3,33	AKT
<i>mapk6</i>	nm_015806	<i>mitogen-activated protein kinase 6</i>	1,55	0,04	4,49	AKT
<i>pgf</i>	nm_008827	<i>placental growth factor</i>	1,53	0,03	6,32	AKT
<i>ccnd1</i>	nm_007631	<i>cyclin d1</i>	1,51	0,04	4,09	AKT
<i>col18a1</i>	nm_009929	<i>procollagen, type xviii, alpha 1</i>	-1,51	0,28	-1,43	-
<i>rgs3</i>	nm_019492	<i>regulator of g-protein signaling 3</i>	-1,51	0,05	-1,67	R
<i>col6a2</i>	nm_146007	<i>procollagen, type vi, alpha 2</i>	-1,52	0,09	-1,92	R
<i>rgs4</i>	nm_009062	<i>regulator of g-protein signaling 4</i>	-1,53	0,17	-2,15	R
<i>thbs2</i>	nm_011581	<i>thrombospondin 2</i>	-1,53	0,04	1,44	-
<i>c1s</i>	nm_144938	<i>complement component 1, s subcomponent</i>	-1,53	0,30	-8,70	R
<i>socs3</i>	nm_007707	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>	-1,54	0,23	-4,08	R
<i>mcam</i>	nm_023061	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>	-1,54	0,07	-1,72	R
<i>hlx1</i>	nm_008250	<i>h2.0-like homeo box 1 (drosophila)</i>	-1,55	0,18	-2,60	R
<i>adamts2</i>	nm_175643	<i>a disintegrin-like and metalloproteinase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 2</i>	-1,63	0,06	-2,02	R
<i>mgst1</i>	nm_019946	<i>microsomal glutathione s-transferase 1</i>	-1,64	0,07	4,52	AKT
<i>col1a2</i>	nm_007743	<i>procollagen, type i, alpha 2</i>	-1,65	0,07	-1,43	-
<i>p2ry14</i>	nm_133200	<i>purinergic receptor p2y, g-protein coupled, 14</i>	-1,66	0,05	4,94	AKT
<i>ifit1</i>	nm_008331	<i>interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	-1,71	0,29	-3,85	R
<i>gata4</i>	nm_008092	<i>gata binding protein 4</i>	-1,75	0,24	-1,43	R
<i>itgb5</i>	nm_010580	<i>integrin beta 5</i>	-1,78	0,06	-1,02	-
<i>bgn</i>	nm_007542	<i>biglycan</i>	-1,81	0,01	-1,92	R
<i>prelp</i>	nm_054077	<i>proline arginine-rich end leucine-rich repeat</i>	-1,92	0,31	-1,89	R
<i>hgf</i>	nm_010427	<i>hepatocyte growth factor</i>	-1,92	0,11	-4,35	R
<i>mfap2</i>	nm_008546	<i>microfibrillar-associated protein 2</i>	-1,95	0,40	-1,12	-
<i>il6st</i>	nm_010560	<i>interleukin 6 signal transducer</i>	-1,96	0,19	-3,28	R
<i>nos3</i>	nm_008713	<i>nitric oxide synthase 3, endothelial cell</i>	-1,96	0,41	-2,60	R
<i>egr1</i>	nm_007913	<i>early growth response 1</i>	-1,98	0,51	-8,70	R
<i>col6a1</i>	nm_009933	<i>procollagen, type vi, alpha 1</i>	-2,12	0,12	-4,65	R
<i>clu</i>	nm_013492	<i>clusterin</i>	-2,15	0,08	-1,77	R
<i>cmkor1</i>	nm_007722	<i>chemokine orphan receptor 1</i>	-2,36	0,98	-1,14	-
<i>lum</i>	nm_008524	<i>lumican</i>	-2,42	0,18	-10,00	R
<i>Irat</i>	nm_023624	<i>lecithin-retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol-o-acyltransferase)</i>	-3,39	0,44	-16,67	R

**Tab. 6: Regulation TGF- $\beta$  assoziierter Gene in allen Experimenten.** Verhältnisse  $<1$  sind als negativ reziproke Werte angegeben. Für die Experimente HSC WT / *Itbp1*<sup>-/-</sup> ist ein Mittelwert aus drei technischen Replikaten der Arrays 85, 90 und 33 mit Standardabweichung ( $\delta$ ) angegeben, für die Experimente aktivierte / ruhende HSC mit den Arrays 40 und 42 nur der Mittelwert (Einzeldaten der Arrays siehe Anhang). Die Klassifizierung eines Gens als Marker für aktivierte (AKT) oder ruhende (R) HSC erfolgte mit dem dem Referenzdatenatz: aktivierte/ruhende HSC (Schwellenwert (+) / (-)-1,5-fach.

Gene-Symbol	GenBank-Acc.No.	Gen-Name	Verhältnis aktivierte HSC: WT / <i>Itbp1</i> <sup>-/-</sup> MW 85, 90, 33	$\delta$	Verhältnis aktivierte WT HSC / ruhende WT HSC MW 40, 42	Marker für aktivierte / ruhende HSC
<i>Itbp1</i>	nm_206958 nm_019919	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	<b>2,61</b>	0,09	<b>1,89</b>	KO/AKT
<i>Itbp2</i>	nm_013589	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 2</i>	<b>-1,38</b>	0,12	<b>1,40</b>	-
<i>Itbp3</i>	nm_008520	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 3</i>	<b>-1,03</b>	0,13	<b>1,54</b>	AKT
<i>Itbp4</i>	nm_175641	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 4</i>	<b>-1,03</b>	0,02	<b>-50,00</b>	R
<i>tgfb1</i>	nm_011577	<i>transforming growth factor, beta 1</i>	<b>-1,16</b>	0,00	<b>-1,79</b>	R
<i>tgfb3</i>	nm_009368	<i>transforming growth factor, beta 3</i>	<b>1,03</b>	0,09	<b>1,50</b>	AKT
<i>tgfb2</i>	nm_009367	<i>transforming growth factor, beta 2</i>	<b>-1,12</b>	0,07	<b>2,60</b>	AKT
<i>tgfa</i>	nm_031199	<i>transforming growth factor alpha</i>	<b>1,02</b>	0,04	<b>-1,09</b>	-
<i>acvr1</i>	nm_007394	<i>activin a receptor, type 1</i>	<b>-1,09</b>	0,06	<b>-1,20</b>	-
<i>acvr2a</i>	nm_007396	<i>activin receptor iia</i>	<b>1,08</b>	0,06	<b>-2,67</b>	R
<i>acvr11</i>	nm_009612	<i>activin a receptor, type ii-like 1</i>	<b>-1,12</b>	0,21	<b>2,09</b>	AKT
<i>tgfbr2</i>	nm_009371 nm_029575	<i>transforming growth factor, beta receptor ii</i>	<b>-1,37</b>	0,13	<b>-1,04</b>	-
<i>fstl1</i>	nm_008047	<i>folliculin-like 1</i>	<b>-1,45</b>	0,04	<b>10,72</b>	AKT
<i>foxb1</i>	nm_007989	<i>forkhead box h1</i>	<b>1,03</b>	0,07	<b>1,41</b>	-
<i>actb</i>	nm_007393	<i>actin, beta, cytoplasmic</i>	<b>1,28</b>	0,03	<b>-1,80</b>	R

#### 4.7.3 Validierung der Microarray-Analyse durch semi-quantitative RT-PCR-Analysen

Zur technischen Validierung der Microarray-Analysen wurden semi-quantitative RT-PCR-Analysen mit denselben HSC WT- und KO-RNAs durchgeführt, die für die Microarray-Analyse verwendet wurden (Abb. 39). Jeweils  $\beta$ -actin (*actb*) und *rps6* dienten als Kontrollen. Für die Überprüfung der Expressionsunterschiede zwischen den aktivierten WT- und KO-Zellen wurden 5 Gene (*clu*, *Irat*, *ifit1*, *cdkor1*, *hgf*), die in den KO-Zellen stärker exprimiert waren und 2 Gene (*Itbp1*, *ptgs2*), die in den WT-Zellen stärker exprimiert waren, ausgewählt (Tab. 5). Alle untersuchten Gene zeigten dabei qualitativ dasselbe differentielle Expressionsmuster wie es nach den Array-Analysen zu erwarten war. Somit konnten die Array-Daten technisch bestätigt werden.

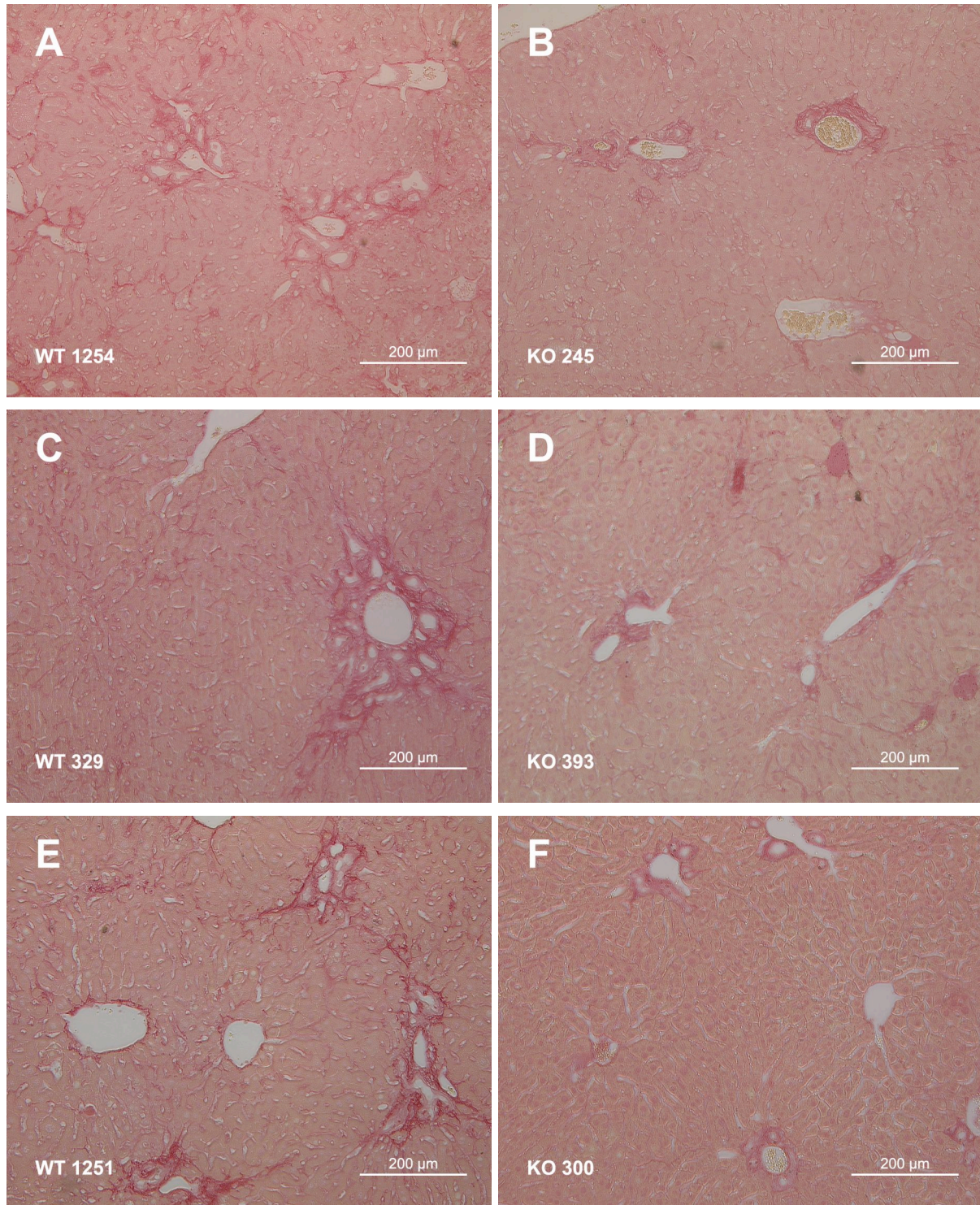


**Abb. 39: RT-PCR-Analyse zur Validierung der Microarray-Daten.** 5 Gene die in den *Itbp1*<sup>-/-</sup>-HSC stärker und 2 Gene die schwächer exprimiert waren als in den, in der Microarray-Analyse verglichenen, WT-HSC wurden durch RT-PCR-Analysen bezüglich der Expressionsunterschiede analysiert und bestätigt. Repräsentative Darstellung aus vier Experimentwiederholungen.

#### 4.7.4 Analyse der *Itbp1*-abhängigen Transdifferenzierung *in vivo*

Die Microarray-Analyse zeigte, dass *Itbp1*-defiziente HSC *in vitro* weniger stark zur Transdifferenzierung neigen als WT-HSC. Um zu überprüfen, ob sich dieser Befund auch auf die Verhältnisse *in vivo* übertragen lässt, wurden in WT und *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Mäusen experimentell eine Leber-Fibrose durch Gallengangsligatur induziert. Nach 4 Wochen wurde schließlich der Fortschritt der ECM-Ablagerung, der in Zusammenhang mit der TGF- $\beta$ -Aktivität steht, vergleichend untersucht. Die Blutparameter Bilirubin, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT), waren bei allen Mäusen stark erhöht und wiesen damit die ikterische Reaktion und Schädigung des Leberparenchyms nach (nicht gezeigt). Durch Sirius-Rot Färbungen, das zur Anfärbung von Kollagen dient (Junquiera et al. 1979, Whittaker et al. 1994), konnte in Leberschnitten der *Itbp1*-defizienten Mäuse eine signifikante Reduktion der Fibrose beobachtet werden. Die Leberschnitte der KO-Tiere wiesen deutlich geringere Ablagerungen fibrillären Kollagens - insbesondere im Bereich des Leberparenchyms - auf. (Abb. 40). Zur Quantifizierung der unterschiedlich starken Kollagen-Ablagerung wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen durchgeführt, die eine Reduktion des Kollagen-Gehalts um durchschnittlich 30 % in *Itbp1*-defizienten Tieren nachwies (nicht gezeigt). Somit konnte die reduzierte Transdifferenzierungsneigung der HSC, die aufgrund der Microarray-Analyse postuliert werden konnte, auch *in vivo* in einem Modell der HSC-Aktivierung gezeigt werden.





**Abb. 40 A - F: Sirius-Rot-Färbung von Leberschnitten nach vierwöchiger Gallengangsligatur.** *Itbp1*-defiziente Mäuse (B), (D), (F) zeigten eine geringere Tendenz zur Ablagerung fibrillären Kollagens als die WT-Tiere (A), (C), (E) insbesondere bei der Ausbreitung von Bindegewebssepten im Parenchym. Gezeigt sind repräsentative Bilder von jeweils drei WT und drei KO-Mäusen. Die Bezeichnung der Tiere ist jeweils angegeben.

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Projekte aus dem Themenkomplex Leber-Fibrose bearbeitet.

Im ersten Teil der Arbeit wurde versucht, einen hepatozytenspezifischen Oberflächenmarker zu etablieren, um aus *in-vitro*-differenzierten ES-Zellen spezifisch hepatische Vorläuferzellen zu isolieren und diese für *in-vitro*-Toxizitäts-Assays einsetzen zu können.

Die Herstellung von hepatozytenartigen Zellen aus embryonalen Vorläuferzellen und adulten und embryonalen Stammzellen hat in den zurückliegenden Jahren besondere Beachtung gefunden. Spezifische Oberflächenmarker, die eine Selektion von Hepatozyten- oder Hepatozyten-Vorläuferzellen, erlaubten waren bis ins Jahr 2005 nicht identifiziert worden (Lavon & Benvenisty 2005). Ab 2005 berichteten verschiedene Autoren über die Differenzierung hepatischer Zellen aus menschlichen und murinen embryonalen Vorläuferzellen. Unter Verwendung verschiedener natürlicher Oberflächenmarker, die spezifisch für Hepatoblasten oder fötale epitheliale Leberzellen (Nierhoff et al. 2005) sind, gelang es, Vorläuferzellen zu isolieren und zur Differenzierung in hepatozytenartige Zellen einzusetzen. Schon früher wurden Stammzellen in der Leber identifiziert (Suzuki et al. 2000, Suzuki et al. 2002) und für Differenzierungsexperimente verwendet. Der Einsatz mesenchymaler Stammzellen aus adultem Knochenmark (*multipotent adult progenitor cells*, MAPC) (Schwartz et al. 2002, Schwartz et al. 2005, Jiang et al. 2002) oder anderer Knochenmarkspopulationen (Yamada et al. 2006) aber auch embryonaler Stammzellen führte ebenfalls zur Erzeugung von hepatozytenartigen Zellen (Abe et al. 1996, Asahina et al. 2004, Chinzei et al. 2002, Hamazaki et al. 2001, Hamazaki & Terada 2003, Hu et al. 2003, Itskovitz-Eldor et al. 2000, Jones et al. 2002, Kuai et al. 2003, Kubo et al. 2004, Kumashiro et al. 2005a, Miyashita et al. 2002, Rambhatla et al. 2003, Teramoto et al. 2005, Yamada et al. 2002). Alle Ansätze zur *in-vitro*-Differenzierung liefern jedoch heterogene Kulturen (Lavon & Benvenisty 2005) und bis heute konnte kein spezifischer Oberflächen-Marker für adulte Hepatozyten identifiziert werden (Shafritz et al. 2006). Daher war die Etablierung eines transgenen Markers das Mittel der Wahl, um reine hepatozytenartige Populationen zu erzeugen.

Durch die Erzeugung eines *egfp*-Fusionsgens konnte der Selektionsmarker eine Doppelfunktion erfüllen. Einerseits konnten die Fluoreszenzeigenschaften des EGFP zur visuellen Identifikation exprimierender Zellen genutzt werden, andererseits ermöglichte die extrazelluläre Lokalisierung des gebildeten Fusionsproteins den Einsatz einer auf Immunmarkierung basierenden Selektionsmethode (MACS) zur Aufreinigung der Zielzellen.

Zur Etablierung des Selektionsmarkers wurden stabil transfizierte ES-Zellen mit konstitutiver Expression des Transgens hergestellt. Die Klonierung in *pDisplay* lieferte ein CMV-Promotor-



getriebenes Expressionskonstrukt, das nach Sequenzierung zur Transfektion von ES-Zellklonen eingesetzt werden konnte. Mit Hilfe dieser Klone konnte die Funktionalität des EGFP fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden. LSM-Schichtaufnahmen wiesen zudem die Plasmamembran-Lokalisierung des Proteins nach. Durch Immunfärbungen unfixierter, lebender Zellen und anschließender durchflusszytometrischer Analysen konnte zusätzlich die extrazelluläre Lokalisation und sterische Zugänglichkeit des für die spätere Isolierung wichtigen Epitops gezeigt werden. Des Weiteren wurde überprüft, ob eine MACS-Selektion von Markergen-exprimierenden Zielzellen aus Mischungen mit negativen Zellpopulationen möglich war. Die MACS-Isolierung führte dabei bei Ausgangs-Zielzellpopulation von bis 20 bzw. 5% in einer Isolierungsrunde zu Reinheiten von ca. 97%. Dies gelang sowohl bei Einsatz einer Zweischnitt- als auch einer Dreischnitt-Markierungsstrategie zur magnetischen Markierung. Die beiden Verfahren unterschieden sich jedoch hinsichtlich der Ausbeute der zurück gewonnenen Zellen. Beim Zweischnitt-Verfahren konnten 40% beim Dreischnitt-Verfahren 22% der in der Ausgangsmischung vorhandenen positiven Zellen isoliert werden. Erfahrungsgemäß führen Immunmarkierungsbasierte Selektionsverfahren zur bevorzugten Anreicherung von Zellen, die über eine starke Epitopexpression verfügen. Weniger stark exprimierende Zellen binden dementsprechend geringere Mengen magnetischer Partikel, die die Bindung an die Isolierungssäule bewirken und gehen daher beim Waschen verloren. Eine weitere Ursache für den Verlust positiver Zellen stellen die Wasch- und Zentrifugationsschritte im Rahmen der Immunmarkierung dar. Eine Möglichkeit zur Reduzierung der benötigten Waschschnitte besteht in der Verwendung einer Einschnitt-Strategie mit direkt an *beads* gekoppelten anti-EGFP-Antikörpern, wobei zu bedenken ist, dass Zwei- und Dreischnittverfahren zur Vermehrung von Epitopen für den *bead*-Antikörper dienen können.

Nach erfolgreicher Etablierung des EGFP-Fusionsproteins als Selektionsmarker wurde die Herstellung eines hepatozytenspezifischen Reporterkonstrukts angestrebt. Die Auswahl des *albumin*-Promotors und Enhancers zur gezielten Expression des Reportergens in hepatozytenartigen Zellen basierte sowohl auf eigenen Analysen zur Expressionspezifität des *albumin*-Gens als auch auf Analyse von Literaturdaten. Studien zur Embryonalentwicklung zeigten, dass Albumin einer der frühesten Marker ist, der bereits in den auswandernden Hepatoblasten kurz nach der Spezifikation des definitiven Endoderms, zusätzlich aber auch in adulten Hepatozyten exprimiert wird. Außerdem wird *albumin* im Gegensatz zu vielen anderen hepatischen Transkripten nicht in anderen embryonalen Geweben exprimiert (Zhao & Duncan 2005). Zusätzlich sprachen eine Vielzahl von Berichten über die erfolgreiche Verwendung des *albumin*-Promotor-Enhancer-Systems in transgenen Zelllinien oder Mäusen für diesen Promotor (Pinkert et al. 1987, Zaret et al. 1988, Linhart et al. 2001, Cole et al. 2002, Matsusue et al. 2003). Darüber hinaus wurden alternative

Promotoren hinsichtlich der Expressionspezifität auf der Grundlage einer Expressionsdatenbank, die die Expressionsdaten einer Vielzahl von Mausgeweben und – Organen enthält, analysiert (Su et al. 2002). Auf die Verwendung des humanen *a1at*-Promotors wurde, trotz der hohen Leberspezifität seiner orthologen Gene in der Maus *spi1-1* bis *spi1-5* verzichtet (Su et al. 2002), da in einem *a1at*-Mausmodell, das in diesem Labor untersucht wurde, unspezifische Expression beobachtet wurde (Dr. Bettina Peters, persönliche Mitteilung). Eine Northern-Blot-Analyse, bei der 12 verschiedene Mausorgane in Bezug auf ihre *albumin*-Expression untersucht wurden, bestätigten die Daten der Expressionsdatenbank.

Der *albumin*-Promotor und Enhancer konnte im Folgenden erfolgreich kloniert werden. Fehler in der Basensequenz des Enhancers konnten korrigiert werden und der 2,8 kb große Enhancer-Promotor-Bereich in das Reportergenkonstrukt eingebracht werden. Aufgrund einer Vielzahl von Berichten über die transkriptionelle Stilllegung (*silencing*) von Transgenen nach heterologer Integration in Säugetiergenome (Chen et al. 2004, Hasegawa & Nakatsuji 2002, Martin & Whitelaw 1996, Milot et al. 1996) wurde das Konstrukt zusätzlich durch  $\beta$ -Globin-Isolator-Sequenzen aus dem Huhn flankiert, die einerseits die Stilllegung der Transkriptionseinheit durch die Ausbreitung von Heterochromatin-Bereichen als auch die Beeinflussung durch andere Enhancer oder Silencer-Elemente verhindern sollen (Hasegawa & Nakatsuji 2002, Bell et al. 2001, Burgess-Beusse et al. 2002, Chung et al. 1997, Felsenfeld et al. 1996, Recillas-Targa et al. 1999, Recillas-Targa et al. 2002). Die funktionelle Expression des EGFP-Fusionsproteins konnte im Folgenden in Maus-Hepatomzellen (HEPA-1-6) bestätigt werden, die gewählt wurden, da diese Zellen mehrere hepatozyten-typische Gene transkribieren, unter anderem auch *albumin*. Die Expression des *egfp*-Fusionsgens wurde auf RNA-Ebene durch RT-PCR-Analysen, Fluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie bestätigt. Auffällig war, dass die Expressionsstärke verschiedener stabil transfizierter HEPA-1-6-Klone variabel war, was aufgrund der Einbettung in die Isolatoren nicht zu erwarten war, da die Verwendung zweier 1,2 kb Isolator-Bereiche nach (Recillas-Targa et al. 2002) zu stärkerer und konstanterer Expression führen sollte als nicht-isolierte Transgene. Parallel getestete R1-ES-Zellklone zeigten jedoch - bei fehlender *albumin*-Expression - keine *egfp*-Expression, so dass an der Spezifität der Expression nicht gezweifelt wurde. Daher wurde das Konstrukt trotz der variablen Expressionstärke für die folgenden Transfektionen der ES-Zellen für die *in-vitro*-Differenzierung und die Generierung einer transgenen Maus per Oozyteninjektion eingesetzt.

Um das *albumin*-Promotor-getriebene *egfp*-Konstrukt zur Selektion von *in-vitro*-differenzierten hepatozytenartigen Zellen verwenden zu können, musste zunächst die *in-vitro*-Differenzierung von embryonalen Stammzellen etabliert werden. Verschiedene Protokolle zur gerichteten und ungerichteten Differenzierung waren zu diesem Zeitpunkt in

der Literatur beschrieben. Um ein stabiles Protokoll zu etablieren, wurden zunächst sechs der beschriebenen Protokolle getestet (Yamada et al. 2002, Hu et al. 2004, Hu et al. 2004, Kuai et al. 2003, Shirahashi et al. 2004, Rambhatla et al. 2003, Kubo et al. 2004, Hamazaki & Terada 2003). Die Methode nach Kubo, bei der durch limitierte Serum-Exposition ein endodermales Schicksal der differenzierenden ES-Zellen begünstigt wird, lieferte die besten Ergebnisse hinsichtlich der Morphologie der entstehenden hepatozytenartigen Zellen und der Expression der erwarteten Markergene. Durch Optimierung der Aussaatdichte und der verwendeten Matrix konnte eine maximale *albumin*-Expression in den IVD-Kulturen erreicht werden. Die exprimierten Markergene waren in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Markern hepatozytenartiger Zellen und verdeutlichten dadurch das Potential *in-vitro*-differenzierter Zellen, insbesondere beim Vergleich der Hepatomzelllinie, die nur ein begrenztes Repertoire an leberspezifischen Transkripten exprimierte. In den *in-vitro*-Kulturen waren, neben einer deutlichen *albumin*-Expression, die Transkriptionsfaktoren HNF3beta und HNF4alpha, die während der endodermalen Spezifikation und der frühen Leberentwicklung (Abe et al. 1996, Fair et al. 2003, Levinson-Dushnik & Benvenisty 1997, Jiang et al. 2005, Zaret 2001, Zaret 2002, Zhao & Duncan 2005), sowie bei der Expression leberspezifischer Transkripte von Bedeutung sind (Pare et al. 2001, Wang et al. 2002, Hayhurst et al. 2001), präsent. Weitere hepatozytentypische Transkripte wie *ttr*, *a1at* bzw. die Maus-Orthologen *spi1-1* bis *spi1-5* (Su et al. 2002, Zhao & Duncan 2005, Lavon & Benvenisty 2005) waren in den IVD-Kulturen - im Gegensatz zu der HEPA-1-6-Zelllinie - deutlich detektierbar. Der heterogene Charakter der Kulturen wird durch den Nachweis folgender Transkripte deutlich: *oct4*-Transkripte sprechen für einen gewissen Anteil undifferenzierter Zellen mit ES-Zell-Charakter (Rossant 2001, Enseñat-Waser et al. 2006), die deutliche Expression von *afp* ist kennzeichnend für einen fötalen Phänotyp (Lavon & Benvenisty 2005), während Transkripte des *cyp7a1*-Gens für einen Anteil reifer Hepatozyten sprechen (Lavon & Benvenisty 2005, Asahina et al. 2004). Zusätzlich zeigten morphologischen Beobachtungen neben den Arealen homogener hepatozytenartiger Zellen auch Agglomerationen nicht näher definierter Zelltypen, wie es für *in-vitro*-differenzierte Kulturen typisch ist (Choi et al. 2002, Hu et al. 2004). Somit wurde deutlich, dass eine weitere Selektion und Differenzierung hepatozytenartiger Zellen sinnvoll ist, um die Homogenität der Kultur zu erhöhen.

Nach der erfolgreichen Adaption des *in-vitro*-Differenzierungs-Protokolls wurden transgene ES-Zellen hergestellt, um die differenzierten hepatozytenartigen Zellen aufgrund ihrer *albumin*-abhängigen MarkerGenexpression selektionieren zu können. Insgesamt wurden 30 transgene Klone einer *in-vitro*-Differenzierung unterzogen und hinsichtlich ihrer *albumin*- und *egfp*-Transkription analysiert. Hierbei wurden mehrere Klone identifiziert, die nach 20-tägiger Differenzierung neben *albumin* auch *egfp* transkribierten. Allerdings war bei allen

untersuchten Klonen, die eine starke *egfp*-Expression nach *in-vitro*-Differenzierung aufwiesen, auch im undifferenzierten ES-Zell-Zustand eine *egfp*-Basalexpression zu beobachten. Dies war also gleichbedeutend mit einer Entkopplung der Transgenexpression von der *albumin*-Expression, die das entscheidende Kriterium zur Selektion der spezifisch differenzierten Hepatozyten sein sollte.

Parallel waren transgene Mäuse mit dem identischen *pTRANS* Reporterkonstrukt hergestellt worden, um die Expressionspezifität *in vivo* zu überprüfen. Die Herstellung der Mäuse erfolgte durch Injektion des linearisierten Reporterkonstruktes in den männlichen Vorkern befruchteter Oozyten. Insgesamt trugen 5 der 32 erzeugten Nachkommen das Transgen (15,6%). Die Verpaarung der Tiere führte zur Etablierung dreier unabhängiger Mauslinien, da zwei der fünf Stammhalter-Tiere keine transgenen Nachkommen hervorbrachten. Dieses Phänomen ist auf die Entstehung von Mosaik-Tieren zurückzuführen, die dann entstehen können, wenn die Integration des Transgens nicht in der ersten Replikationsrunde des Genoms im Vorkern stattfindet und kann passieren, wenn die Replikation des Genoms in den haploiden Vorkernen zum Zeitpunkt der Injektion bereits abgeschlossen ist (Nagy 2003, Wilkie et al. 1986). Zusätzlich könnten transgene Zellen, je nach Integrationsort des Transgens in dem Mosaik-Organismus, einen Selektionsnachteil in der Embryogenese haben oder lediglich zufällig nicht zur Besiedelung der Keimbahn beitragen oder darin unterrepräsentiert sein (Wilkie et al. 1986). Dies könnte die schlechte Transgentransmission des Stammhalters 448 erklären, die sich in der F1-Generation normalisierte. Bekannt ist zudem, dass in Abhängigkeit vom Transgen-Integrationsort die Bildung kompetitiver Spermien in Mosaik-Tieren verhindert werden kann (Ellison et al. 2000).

Die Analyse der Genexpression in den drei transgenen Linien bestätigte die Beobachtung aus den transgenen HEPA-1-6-Zellen, bei der unterschiedliche Klone variable Expressionsstärken des EGFP aufwiesen. Nur sieben von 19 transgenen Tieren zeigten eine detektierbare *egfp*-Transkription. In Leberlysaten der am stärksten exprimierenden Mäuse waren trotz des Einsatzes der 50-fachen Proteinmenge im Vergleich zu Lysaten von transgenen HEPA-1-6-Zellen nur Spuren von EGFP zu detektieren. Auf gleiche Weise präparierte Lysate einer Maus mit *β-actin*-Promotor-getriebener Expression des löslichen EGFP verdeutlichten zudem, dass selbst in HEPA-1-6-Zellen nur eine vergleichsweise moderate Expression des Transgens stattfindet, wobei zu beachten ist, dass die Transkription in den verglichenen Systemen von unterschiedlichen Promotoren kontrolliert wird.

Die Tatsache, dass in den transgenen Mäusen nur vereinzelt eine schwache Transkription und kaum EGFP-Protein nachgewiesen werden konnte in Kombination mit der beobachteten Variabilität der Expressionsstärke der transfizierten HEPA-1-6-Zellen und der unspezifischen Expression in den ES-Zellen vor der Differenzierung legte den Schluss nahe, dass die verwendeten Isolator-Sequenzen nicht, die in der Literatur berichtete Abschirmungswirkung

ausübten. Vielmehr schienen in allen Fällen Positionseffekte zu einer Beeinflussung der Expression zu führen. Im Falle der transgenen Mäuse und der HEPA-1-6 Zellen führen diese Positionseffekte offensichtlich mehr oder weniger stark zu einer Repression der Transkription, möglicherweise verursacht durch benachbarte Silencer-Elemente oder gar die Stilllegung des Genlokus durch Ausbreitung kondensierten Chromatins (Burgess-Beusse et al. 2002), wobei letzteres Phänomen wohl in erster Linie bei den transgenen Tieren eine Rolle spielen dürfte. Bei den transgenen ES-Zellen scheinen zudem distale Enhancer-Elemente eine Fehlexpression des Transgens zu verursachen, da die ES-Zellen trotz fehlender *albumin*-Expression das Transgen exprimierten.

Die bekannten Probleme transgener Systeme hinsichtlich der Stabilität und Spezifität der Transgenexpression konnten durch die Einbettung in Isolator-Elemente somit nicht behoben werden. Vielversprechend scheint in diesem Zusammenhang die gerichtete Integration von Transgenen in etablierte Loci (Zhao et al. 2001), wie etwa dem ROSA-26-Locus (Jäger et al. 2004, Zambrowicz et al. 1997), der sich durch sehr hohe Rekombinationsraten und stabile Transgenexpression auszeichnet.

Eine Alternative zur heterologen Strategie zum Einbringen des Transgens bestand daher von Anfang an in der Herstellung homolog rekombinierter ES-Zellen durch die gezielte Manipulation des *albumin*-Locus. Dazu wurde ein *targeting*-Konstrukt kloniert, das zur Integration des *egfp*-Fusionsgens hinter dem offenen Leserahmen des *albumin*-Gens dienen sollte. Nach erfolgreicher Integration hätte die Transkription des veränderten Allels zur Bildung einer dicistronischen mRNA geführt. Die Translation des Transkripts sollte durch ein IRES-Element bewerkstelligt werden.

Insgesamt wurden 647 G418-resistente Klone durch Southern-Blot-Analyse auf die homologe Integration des *targeting*-Konstrukts untersucht. Das Screening erfolgte zunächst mit einer internen Sonde deren Basensequenz komplementär zu einem Teil des 5'-Homologiebereiches des *targeting*-Konstruktes ist. Somit waren neben der Bande des WT-Locus auch alle heterolog integrierten *targeting*-Konstrukte im Southern-Blot zu erkennen. Zur Analyse wurden jeweils zunächst 3 Klone pro Gelspur analysiert und vielversprechende Kandidaten im Folgenden mit einer externen Sonde einzeln überprüft. Kein Klon erwies sich dabei als homolog rekombiniert. Der Grund für das fehlgeschlagene *gene targeting* lässt sich nicht genau eingrenzen. Die Homologiebereiche liegen mit einer Größe von 1,3 kb und 5,7 kb und damit insgesamt 7 kb im Bereich der empfohlenen Mindestgröße (Joyner 2000). Zudem erfolgte die Amplifizierung mit DNA, die isogen zu den verwendeten ES-Zellen ist. Der kurze Arm wurde vollständig sequenziert, der lange Homologiearm, der ausschließlich stromabwärts des *albumin*-Gens liegt und keine kodierenden Elemente enthält, wurde in Teilen sequenziert, so dass an der Richtigkeit der verwendeten Sequenzen kein Zweifel besteht. Die Anzahl der untersuchten Klone hätte, statistisch betrachtet, zum Auffinden eines

homologen Rekombinationsereignisses führen sollen. Dies wird deutlich, da für das *albumin*-Gen ein analoger *gene-targeting* Ansatz publiziert wurde, der zur Integration eines IRES-Cre-Elementes am Ende des *albumin*-ORF diente (Schuler et al. 2004). Sechs der 226 untersuchten Klone waren in diesem Fall homolog rekombiniert. Die Lage und Gesamtlänge der Homologiebereiche war fast identisch und es wurde ebenfalls auf einen Negativselektionsmarker verzichtet. Die Selektion erfolgte wie in dieser Arbeit ausschließlich mit einem Positivselektionsmarker, dem *neomycin-phosphotransferase*-Gen. Zur weiteren Verfolgung der *targeting*-Strategie wäre daher eine zusätzliche Verwendung eines Negativselektionsmarker denkbar, um die Anzahl der Klone mit heterologen Integrationen von vorne herein zu reduzieren. Als guter Negativselektionsmarker hat sich beispielsweise das *diphtheria-toxin*-Gen erwiesen, das im Gegensatz zum *thymidinkinase*-Gen ohne weitere Mediumszusätze seine zytotoxische Wirkung im Falle einer heterologen Rekombination entfaltet. Eine Verlängerung der Homologiebereiche, insbesondere des 5'-Homologiebereichs, könnte zudem die Rekombinationswahrscheinlichkeit positiv beeinflussen und wäre zur Weiterverfolgung des Ansatzes zu erwägen.

Der *gene-targeting* Ansatz führte nicht zu den erwarteten homolog rekombinierten ES-Zellklonen und die heterologen ES-Zellklone, die durch stabile Transfektion des Konstrukts *pTRANS* mit dem *albumin*-Enhancer-Promotor-Element hergestellt wurden, zeigten eine unspezifische Expression. Die *in vivo* Daten der transgenen Mäuse legten zudem den Schluss nahe, dass die Klonierung der Isolator-Elemente nicht zur Abschirmung vor Positionseffekten führte. Zu diesem Zeitpunkt erschien eine Veröffentlichung eines weitestgehend analogen Ansatzes zur Generierung von Hepatozyten aus transgenen ES-Zellen (Teratani et al. 2005). Die Autoren verwendeten ebenfalls ES-Zellen mit *albumin*-Promotor getriebener Expression löslichen EGFPs. Dazu wurde das gleiche *albumin*-Enhancer-Element, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde und ein verkürzter *albumin*-Minimal-Promotor verwendet. Die starke Expression des EGFP erlaubte die Optimierung des *in-vitro*-Differenzierungs-Protokolls, so dass nach 18-tägiger Kultivierung 80% der Zellen EGFP-positiv waren und Marker adulter Hepatozyten exprimierten. Durch eine FACS-Aufreinigung wurde im Folgenden eine annähernd reine Kultur mit 98% GFP-positiven *in-vitro*-differenzierten Hepatozyten hergestellt. Das in dieser Arbeit verfolgte Projekt zur Generierung von per MACS selektionierbaren *in-vitro*-differenzierten Hepatozyten wurde zunächst eingestellt, da die Grundlage einer spezifisch exprimierenden ES-Zelllinie zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss des *latent transforming growth factor beta binding protein 1* (LTBP1) auf die Aktivierung bzw. Transdifferenzierung hepatischer Sternzellen (HSC) *in vitro* und *in vivo* untersucht.

TGF- $\beta$  hat eine Vielzahl von Funktionen während der normalen Entwicklung und unter pathologischen Bedingungen. Zu den wichtigsten Wirkungen zählen die Inhibition der Proliferation insbesondere epithelialer Zellen, die Inhibition vielfältiger Funktionen des Immunsystems und die Förderung der Sekretion von ECM-Komponenten (Hyytiäinen et al. 2004, Moses 1992). Studien mit TGF- $\beta$ 1 *knock-out*-Mäusen, die eine verminderte Lebenserwartung aufgrund schwerer immunologischer Reaktionen haben (Shull et al. 1992), konnten zeigen, dass TGF- $\beta$ 1 von entscheidender Bedeutung bei der Aufrechterhaltung des aktivierten Zustands hepatischer Sternzellen *in vivo* ist (Hellerbrand et al. 1999).

KO-Studien der *ltbp*-Isoformen -2 bis -4 haben eine direkte oder indirekte Rolle während der Entwicklung (Shipley et al. 2000), der Gewebsdifferenzierung und Knochenbildung nachgewiesen (Chen et al. 2003, Dabovic et al. 2002a, Dabovic et al. 2002b, Koli et al. 2004, Sterner-Kock et al. 2002). Zur Ergründung der Rolle des LTBP1, dem für die Sekretion und Kontrolle der Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$  eine entscheidende Rolle zuzukommen scheint, wurde eine *ltbp1-knock-out*-Maus hergestellt, in der durch Disruption des Exon 5 die Bildung beider bekannten LTBP1-Isoformen, LTBP1-L und LTBP1-S ausgeschaltet wurden. Dieses Mausmodell wurde im Rahmen dieser Arbeit insbesondere hinsichtlich des fibrogenen Potentials der HSC näher charakterisiert.

Die Analyse zur Überprüfung des funktionellen *knock-out* der LTBP1-L Isoform erfolgte durch RT-PCR-Analysen. In drei für die Expression des *ltbp1* bekannten Geweben sollte das Ausbleiben eines die Exons 4 bis 6 beinhaltenden Transkripts den Beweis für den geglückten KO sein. Ein entsprechendes Amplifikat war wie erwartet nur in WT-Geweben nachweisbar, wodurch die Ausschaltung der LTBP1-L-Variante gezeigt werden konnte. Allerdings fanden sich sowohl in WT- als auch in KO-Geweben verkürzte Amplifikate, die auf das Vorhandensein von mRNA-Spleissvarianten hindeuteten. Zur genaueren Analyse wurden die verkürzten cDNAs sequenziert. Dabei wurden eine bis dahin in der Maus nicht beschriebene Spleissvarianten identifiziert, die jedoch in ähnlicher Form in der Ratte und beim Menschen entdeckt wurden (Oklü et al. 1998b, Oklü et al. 1998a, Gong et al. 1998, Michel et al. 1998). Die entsprechende mRNA entsteht durch Spleissen des Exon 4 an Exon 6 unter einem Umspleissen der für das *targeting* verwendeten Region des Exon 5. Das theoretisch abgeleitete Protein hätte im Gegensatz zu LTBP1-L ein um 5 kD kleineres theoretisches Molekulargewicht von 181 kD. Die funktionelle Expression dieser Spleissvariante wurde bis dato jedoch in keiner der untersuchten Spezies nachgewiesen. Ob diese Variante funktionell von Bedeutung ist muss daher in Folgeanalysen untersucht werden. Möglicherweise existieren noch unbekannte Proteinvarianten des LTBP1, die den

Ausfall der LTBP1-L und -S Variante zumindest teilweise kompensieren können und den relativ milden Phänotyp der Maus erklären.

Die *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Maus diene schließlich zur Untersuchung des Einflusses des LTBP1 auf die Aktivierung hepatischer Sternzellen *in vitro* und *in vivo*. Zur Untersuchung der Aktivierung von HSC hat sich ein *in-vitro*-Aktivierungs-/Transdifferenzierungs-Modell bewährt (Kmieć 2001, Tsukamoto et al. 1990, Borkham-Kamphorst et al. 2004b). Obwohl *in-vitro*-Experimente stets mit Vorbehalt in Bezug auf die Übertragbarkeit auf die *in-vivo*-Situation betrachtet werden müssen, erlauben sie doch oftmals die Ableitung genereller Wirkmechanismen (Kristensen et al. 2000).

Zur Kontrolle der Reinheit der verwendeten HSC-Präparationen wurden einen Tag nach der Isolierung fluoreszente Immunfärbungen vorgenommen. Als Marker zum Nachweis ruhender HSC diene GFAP, das nach Aktivierung in Kultur nicht mehr exprimiert wird (Geerts 2001). Die Präparationen enthielten einen Tag nach der Isolierung zwischen 65 und 70% GFAP positive Zellen. Dabei handelt es sich insofern um eine konservative Einschätzung, da neben den GFAP-positiven Zellen auch andere Zellen mit typischer HSC-Morphologie und charakteristischen, autofluoreszenten Lipidtröpfchen beobachtet wurden. Die Reinheit liegt dabei in dem Bereich der mit der konventionellen Präparationsmethode zu erwarten ist (Geerts et al. 1998). Weitere Kultivierung auf Plastik führt zu einer Selektion von HSC (Cassiman & Roskams 2002), so dass insbesondere bei den aktivierten Proben nach sechstägiger Kultivierung mit annähernd reinen Populationen von HSC zu rechnen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der *in-vitro*-Aktivierung mit Hilfe von Microarray-Analysen untersucht. Für jedes Experiment wurden Zellen von je 5 männlichen Tieren vereint und gemeinsam kultiviert. Dies war einerseits aufgrund der systematisch bedingten begrenzten Ausbeute an Zellen vorteilhaft, andererseits war es für die Generalisierung der Ergebnisse von Bedeutung, da somit individuelle Genregulationsphänomene vernachlässigbar kleinen Einfluss nehmen.

Vorversuche mit Fibroblasten-Proben dienten zur Festlegung des systembedingten Auflösungsvermögens von Expressionsunterschieden und zeigten die Reproduzierbarkeit der Microarray-Daten durch Verwendung unabhängig amplifizierter RNA-Proben.

Daraufhin wurde ein genereller Vergleich ruhender, lediglich für einen Tag kultivierter HSC und aktivierter, für 6 Tage kultivierter HSC vorgenommen. Daten dazu waren bislang nicht erfasst worden. So existieren lediglich Genexpressions-Analysen zur Transdifferenzierung humaner HSC (Schnabl et al. 2005a) und im Falle der Maus Vergleiche zwischen HSC nach dreitägiger Kultivierung und voll transdifferenzierten MFB nach dreimaliger Passagierung (Liu et al. 2004). Daher gewährt der hier erfasste Datensatz zum ersten Mal Einblick in die differentielle Genexpression von ruhenden HSC im Vergleich zu aktivierten HSC. Einerseits



zeigte sich die deutliche Stressantwort in Reaktion auf das Isolierungsverfahren auf der Seite der ruhenden HSC, was sich u. a. in der Expression von Hitzeschock-Proteinen äußerte. Andererseits waren eine Vielzahl der in der Literatur beschriebenen Marker ruhender HSC deutlich stärker exprimiert als in den aktivierten Zellen u. a. LRAT (Matsuura et al. 1999), CD36 (Fettsäure-Translokase) (Hellemans et al. 2003), die Proteoglycane Decorin und Lumican (Gressner et al. 1994) sowie die nicht-fibrilläre Kollagen-Typ-VI-alpha-Kette (Gressner & Bachem 1990, Gressner & Bachem 1995), HGF (Ramadori et al. 1992), FCGR1 (Fc-Rezeptor) und CD74 (MHC-Klasse-II-Komplex, invariante Kette) (Winau et al. 2006). Auf Seite der aktivierten HSC waren neben bekannten Markern wie ACTA2 (*smooth muscle actin*), SPP1 (Osteopontin) (Kawashima et al. 1999), mehreren MMPs und TIMP-1 und -2, aber auch die noch nicht in diesem Zusammenhang beschriebenen TIMP-3, THBS1, THBS3 und TM4SF1. Letzterer Marker ist ein Mitglied der Tetraspanin-Familie, die im Zusammenhang mit der Motilität aktivierter HSC stehen (Mazzocca et al. 2002).

Darüber hinaus stellte sich dieser Datensatz als essentielles Kriterium heraus, um die geringen aber konsistenten Expressionsunterschiede zwischen aktivierten WT- und KO-HSC klassifizieren zu können. Diese geringen Unterschiede ließen sich zudem technisch mittels semi-quantitativen RT-PCR-Analysen bestätigen. Alle Gene die per RT-PCR auf die entsprechenden Expressionsunterschiede hin untersucht wurden, zeigten den nach den Arraydaten erwarteten Expressionsunterschied. Trotz der geringen Unterschiede sprachen die Ergebnisse in der Summe betrachtet für einen insgesamt reduzierten Aktivierungsgrad *ltbp1*-defizienter HSC *in vitro* und bestätigte die Rolle des LTBP1 während des Prozesses der HSC-Transdifferenzierung. Auf Genexpressionsebene konnten keine kompensatorischen Regulationen von LTBP oder TGF- $\beta$  Isoformen in *ltbp*<sup>-/-</sup>-HSC während der Aktivierung beobachtet werden, wodurch TGF- $\beta$ , wenn überhaupt, nur ineffizient als *small latency complex* exportiert werden kann (Miyazono et al. 1991, 1992). Zwei Faktoren, die im *in-vitro*-System zum Tragen kommen, könnten die relativ geringen Genexpressions-Unterschiede der WT- und KO-Zellen erklären. Zum einen fehlt in der *in-vitro*-Kultur insbesondere zu Beginn der Kultivierungsphase die komplexe ECM, die in der Leber anzutreffen ist. Dies kann dazu beitragen, dass die in den WT-Zellen gebildeten *large latency complexes* weniger stark lokal immobilisiert und aktiviert werden können und zudem durch die möglicherweise ineffiziente ECM-Verankerung beim Medienwechsel entfernt werden. Zudem könnte ein systematisches Erfordernis des Versuchsansatzes eine Rolle spielen. Die *in-vitro*-Aktivierung erfordert den Zusatz von 10% fötalen Kälberserums im Medium, da die darin enthaltenen Wachstumsfaktoren für die Proliferation der Zellen nötig sind. Insbesondere PDGF ist ein essentieller Faktor für die Proliferation und die Initiation der Transdifferenzierung (Borkham-Kamphorst et al. 2004a). Ebenso ist ein gewisser Teil TGF- $\beta$  in Kälberserum enthalten,

wodurch möglicherweise die intrinsische Unfähigkeit zur effektiven Sezernierung von TGF- $\beta$  *ltbp1*-defizienter HSC in Teilen überlagert wird.

Die Microarray-Analyse zeigte, dass elementare Komponenten der normalen hepatischen ECM wie Decorin, Biglycan, Lumican und die nicht-fibrillären Kollagene in den KO-HSC stärker exprimiert waren. Das Gen *Irat*, das die Lecithin:Retinol-Acetyltransferase (LRAT) kodiert und ein zentraler Regulator des Vitamin-A-Metabolismus in HSC ist (O'Byrne et al. 2005, Matsuura et al. 1999, Geerts 2001), war in den KO-HSC sogar deutlich stärker exprimiert als in den WT-HSC. Eine hohe Expressionsrate ist kennzeichnend für den ruhenden Phänotyp (Zolfaghari & Ross 2000). Abbauprodukte des Vitamin-A (9,13-di-cis-Retinsäure) im Gegensatz dazu führten zur Induktion der Plasminogen-Aktivator-Synthese (PA) und damit zur PA/Plasmin-abhängigen LTBP1-LLC Aktivierung *in vitro* (Imai et al. 1997). In den WT-Zellen waren deutliche Anzeiger für den aktivierten Zustand stärker exprimiert, so die Matrix-Metalloproteasen-10 und -13 (Iredale et al. 1995, Milani et al. 1994, Lee et al. 2003) und interessanterweise auch hier der noch nicht beschriebene Oberflächenrezeptor TM4SF1.

Die abgeleitete Hypothese aus den *in-vitro*-Experimenten, dass *ltbp1*-defiziente HSC weniger stark zur Aktivierung neigen, wurde im Folgenden in einem experimentellen Modell zur Induktion der Leber-Fibrose in der Maus überprüft. Nach vierwöchiger Gallengangsligatur wurden in WT- und KO-Tieren der Grad der Leber-Fibrose anhand der Kollagendeposition in der Leber beurteilt. Alle Tiere hatten zuvor deutlich erhöhte Leberblutwerte aufgewiesen, was ein Indiz für die erfolgreiche Gallengangsligatur und eine Schädigung der parenchymalen Leberzellen ist. Die Gewebsschnitte *ltbp1*-defizienter Mäuse wiesen - wie aufgrund der *in-vitro*-Daten erwartet - weniger fibrilläres Kollagen im Bereich der Portalfelder und des Parenchyms auf als bei den WT-Vergleichstieren. Insbesondere die weniger starken parenchymalen Septen in den KOs deuten auf eine reduzierte fibrogene Aktivität aktivierter HSC hin. Quantitative Western-Blot-Analysen ergaben zudem, dass der durchschnittliche Kollagen-Gehalt in KO-Tieren um 30% reduziert war.

Somit konnte sowohl *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass der *knock out* von *ltbp1* zu einer Verminderung des fibrogenen Potentials der HSC führt. Zwar war in allen Modellen eine HSC-Aktivierung trotz des KOs zu beobachten, der Grad der Aktivierung war jedoch reduziert. Damit bestätigen die Daten die Beobachtung mit TGF- $\beta$ -1 KO-Tieren, die nach CCl<sub>4</sub>-induzierter Fibrose ebenfalls eine Fibrose entwickelten, die bei den KO-Tieren jedoch nicht entsprechend aufrechterhalten wurde (Hellerbrand et al. 1999). Auch ein adenoviraler Ansatz mit TGF- $\beta$ 1 antisense RNA zur Reduktion der TGF- $\beta$ -1-Aktivität in kultivierten Ratten-HSC und gallengangsligierten Ratten lieferte entsprechende Befunde (Arias et al. 2003, Arias et al. 2002). Die Tatsache, dass in der Leber die Ausschaltung des *ltbp1* zu einer Verminderung des Fibrosegrades führt, spricht für die Relevanz des LTBP1 bei der Kontrolle

---

der Sezernierung und Bioverfügbarkeit von TGF- $\beta$ . Dabei lässt sich aufgrund der *in-vivo*-Daten nicht im Einzelnen die relative Relevanz des LTBP1 für die an der Induktion und Aufrechterhaltung der Fibrose beteiligten Zelltypen aufschlüsseln. Denkbar ist, dass Kupffer- oder Endothelzellen TGF- $\beta$  auch in der Form des SLC sezernieren können. Die *in vitro* Daten legen jedoch nahe, dass der LTBP1-abhängige Export von TGF- $\beta$  in HSC von Bedeutung ist, und dass eine Ausschaltung von TGF- $\beta$  und des TGF- $\beta$  kontrollierenden Export- und Kontrollwegs mit Hinblick auf klinische Applikationen viel versprechend ist, um Einfluss auf die Pathogenese der Leber-Fibrose nehmen zu können.

## 6 Ausblick

Die Etablierung eines Hepatozyten-Toxizitäts-Assays mit Hilfe *in-vitro*-generierter Hepatozyten aus embryonalen Stammzellen scheiterte, da keine ES-Zelllinie etabliert werden konnte, die das für die Selektion der differenzierten Hepatozyten angestrebte transgene Oberflächenepitop spezifisch exprimiert. Die mittlerweile veröffentlichten verbesserten Methoden zur Differenzierung von Hepatozyten aus embryonalen Stammzellen basierten auf einem nahezu analogen Ansatz zur Selektion der Zielzellen mit *albumin*-Promotor-getriebener EGFP-Expression. Lediglich die Isolierung per FACS unterschied sich von der hier angestrebten MACS-Methode. Zur Weiterverfolgung dieses Ansatzes, wäre die Herstellung einer das Markerepitop spezifisch exprimierende Zelllinie zwingende Voraussetzung. Die Erfahrungen mit den unterschiedlichen transgenen Ansätzen legen dafür die Herstellung rekombinanter Linien auf Basis der homologen Rekombination nahe, entweder durch *gene targeting* charakterisierter bzw. für ihre verlässliche Transgenexpression bekannter Loci oder, wie in dieser Arbeit parallel verfolgt, in den *albumin*-Locus selbst. Obwohl der *targeting*-Ansatz fast analog zu einem unabhängig in der Literatur beschriebenen Ansatz konzipiert und durchgeführt wurde, konnten keine homolog rekombinierten Klone gewonnen werden. Möglicherweise lässt sich in diesem Fall jedoch durch eine Modifikation des *targeting*-Konstrukts - durch Verlängerung der Homologiebereiche und das zusätzliche Einbringen eines Negativselektionsmarkers - schon bald ein geeigneter Klon identifizieren und für *in-vitro*-Differenzierungs-Studien verwenden.

Die Analysen zur Rolle des LTBP1 bei der Aktivierung hepatischer Sternzellen zeigten, dass die Verfügbarkeit von LTBP1 entscheidenden Einfluss auf den Grad der Aktivierung von HSC und damit auf die Pathogenese der Leber-Fibrose hat. Zur weiteren Analyse der Rolle des LTBP1 sind mehrere Ansätze denkbar. Einerseits sind dabei technische Aspekte des *in-vitro*-Transdifferenzierungssystems von Interesse. So wäre es wünschenswert, langfristig zur Formulierung eines synthetischen Minimalkulturmediums zu gelangen. Damit ließen sich im Einzelnen die Rollen der verschiedenen an der Pathogenese beteiligten Wachstumsfaktoren klären und zusätzlich die genaue Rolle der autokrinen TGF- $\beta$  Signalschleife in HSC klären. Des Weiteren wäre es denkbar - basierend auf den gewonnenen Microarray-Daten und evtl. zusätzlich zu generierender Expressionsprofile - Oberflächenmarkergene ruhender und aktivierter HSC zu identifizieren, die zur Isolierung beider Zellzustände genutzt werden könnten. Im Falle der ruhenden HSC böte dies die Möglichkeit, die Reinheit der Kultur von Beginn an zu erhöhen, im Falle der aktivierten HSC würde ein Oberflächenmarker erst die

Isolierung *in-vivo*-aktivierter HSC ermöglichen, da der Verlust der Lipidtröpfchen während der Aktivierung eine Isolierung per Dichtegradientenzentrifugation erschwert.

Andererseits müssen Folgeanalysen zudem Gewissheit darüber liefern, welche bis dato bekannten und evtl. noch zu identifizierende Spleissvarianten tatsächlich proteinogen und damit – neben LTBP1-L und LTBP1-S - biologisch von Bedeutung sind.

Zur weiteren Validierung der gewonnenen Erkenntnisse können alternative Modelle zur Repression von aktivem LTBP1 herangezogen werden. Eine Möglichkeit stellt die systemische oder die *in-vitro*-Applikation von spezifischen anti-LTBP1-Antikörpern, die zur Inhibition der TGF- $\beta$ -Aktivierung führen, dar. Eine weitere Alternative bieten RNAi-basierte Strategien zum Gewebs- oder zelltypspezifischen *knock down* der *ltbp1*-Expression. Die Verwendung transgener Mäuse mit induzierbarer anti-*ltbp1*-siRNA-Expression, die – je nach Zielsequenz - möglicherweise eine Degradierung aller bekannten und bis dato unbekanntem *ltbp1*-mRNA-Varianten zur Folge hat, könnte zum weiteren Verständnis beitragen und ein noch generelleres Bild über die Funktionsweise und klinische Relevanz des LTBP1 liefern.

## 7 Material und Methoden

### 7.1 Enzyme, Antikörper und rekombinante Proteine

ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems / Perkin Elmer
<i>SUPERScript II</i> RT-Kit	Invitrogen
<i>Taq-Polymerase</i>	Invitrogen
<i>Elongase-Enzym-Mix</i>	Invitrogen
anti-GFP-HRP-Antikörper	Miltenyi Biotec
<i>Kollagenase P</i>	Roche
<i>Pronase E</i>	Merck
full length A. v. EGFP Polyclonal AB	Clontech
R-PE-goat-anti-rabbit	Molecular Probes
AffiniPure Goat-anti-rabbit IgG (H+L)	Dianova
anti-PE-beads	Miltenyi Biotec
Goat-anti-rabbit-beads	Miltenyi Biotec
Kaninchen-anti-GFAP, G9269	Sigma-Aldrich
Ziege-anti-Kaninchen-FITC, F2765	Molecular Probes
<i>DNAseI</i>	Ambion, Roche
<i>Proteinase K</i>	Roche
<i>RNAseA</i>	Roche
<i>RNAseH</i>	Invitrogen
<i>alkalische Phosphatase</i>	Roche
<i>DNA Polymerase I</i> , large (Klenow) fragment	NEB
<i>T4-DNA-Ligase</i>	Promega
humanes Chorio-Gonadotropin	Sigma-Aldrich
Gonadotropin	Sigma-Aldrich
<i>Hyaluronidase</i>	Sigma-Aldrich
Allophycocyanin (APC)	Cyanotech

### 7.2 Chemikalien + Lösungen

Alle Chemikalien und Reagenzien, bei denen im Methodenteil kein Hersteller aufgeführt ist, wurden von Merck und alle Zellkulturmedien und Puffer von Invitrogen bezogen. Wässrige Lösungen wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> angesetzt und wenn erforderlich zur Sterilisation autoklaviert oder steril filtriert.

### 7.3 Reagenziensätze

RNA 6000 Pico Assay	Agilent Technologies
Total RNA Isolation NucleoSpin®RNAII	Macherey & Nagel
Gel extraction NucleoSpin®ExtractII	Macherey & Nagel
RNA Clean-up NucleoSpin®RNA Clean-up	Macherey & Nagel
Rediprime DNAlabeling system	GE Healthcare
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce
ECL+-Kit	GE Healthcare
FASER-Kit-APC	Miltenyi Biotec
µMACS GFP Isolation Kit	Miltenyi Biotec

### 7.4 Sonstige Materialien

Extra thick Blot Paper (Mini Blo size)	BioRad
Hybond-P PVDF-Membran	GE Healthcare
Hybond-XL Nylon-Membran	GE Healthcare
Gelatine Typ A	Sigma-Aldrich
Elektroporationsküvette (Typ 165-2107)	BioRad
NAP-10-Säulen	GE Healthcare
PD10-Säulen	GE Healthcare
Superdex 200 16/60-Säule	GE Healthcare
Mikrokonzentratoren (Microcons), Typ YM-10,	Millipore
Neubauer Zählkammer	Brand
Separationssäulen: µ-Säulen, MS-Säulen	Miltenyi Biotec
Kanüle, 26G ½“, kurz,	Braun

### 7.5 Geräte

NanoDrop	NanoDrop Technologies Inc.
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies
Trans-Blot SD SemiDry Transfer Cell	BioRad
LSM 510	Carl Zeiss
Axioskop 2+	Carl Zeiss
Mikroskop-Lichtquelle ebq 100 – HBO 100	Carl Zeiss
Cryo 1°C-Einfriercontainer	Nalgene
Gene Pulser	BioRad
Durchflusszytometer: FACScalibur™	BD Biosciences
MACS-Separatoren: µ-; Mini-MACS	Miltenyi Biotec
Sterilwerkbank: Hera Safe	Heraeus
Inkubator: Hera Cell	Heraeus
Waage: APX-200	Denver Instruments

Waage: SPB61	Scaltec
Blockthermostat BT 1301	HLC
Bakterieninkubator	WTB Binder
Wasserbäder	Julabo
Zentrifuge: Eppendorf 5415D	Eppendorf
Zentrifuge: Megafuge 1.0	Heraeus
Cyclone Storage Phosphor System	Packard
UV Stratalinker™ 2400	Stratagene
Thermocycler: PTC-225	MJ Research
Multiplate reader: Genios	Tecan
Brutschrank: Labotec Gasboy C40	Labotec
Micro-Manipulator: Leitz TypM	Leitz
Steuereinheiten Cell Tram Oil und Cell Tram Air	Eppendorf
Haltekapillare: nach Zimmermann, gerade, GC100T-10 Clark Glas;	Gündel BioMedical Instruments
Injektionskapillare: mit Dorn, GC100T-10 Clark Glas	Gündel BioMedical Instruments
Stereomikroskop 2000-C	Carl Zeiss
Mikroinjektor: Transjector Typ 5246	Eppendorf

## 7.6 Verwendete Computerprogramme

LaserGene	DNASTAR
OptiQuant 3.00	Packard Instruments
LSM Image Browser Version	Carl Zeiss
AxioVision Version 3.1	Carl Zeiss
CellQuest Version 3.1 und 3.3	Beckton Dickinson (BD)
WinMidi Ver. 2.8	Joe Trotter
Sequence Analysis 3.0	Applied Biosystems



## 7.7 Bakterienstämme

Tab. 7: Verwendete Bakterienstämme.

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Referenz</b>
DH5 $\alpha$ <sup>TM</sup>	<i>F- <math>\phi</math>80lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 <math>\lambda</math>-</i>	Vermehrung von Plasmiden	Invitrogen

## 7.8 Zelllinien

Tab. 8: verwendete Zelllinien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
HEPA 1-6 (ACC 175)	Maus Hepatomzelllinie	(Darlington et al. 1982)
HM1-ES-Zellen	Murine ES-Zelllinie Abgeleitet aus einer hp <sup>r</sup> t-defizienten 129/Ola-Mauslinie, die aus Blastozysten-Injektionen von E14TG2a-ES-Zellen hervorgegangen war	(Magin et al. 1992)
R1-ES-Zellen	Abgeleitet von 129X1/SvJ and 129 S1/Sv- +p+Tyr-c MgfSI-J/+ Kultivierung auf primären, mitoseinaktivierten Maus-Fibroblasten (PMEF)	(Nagy et al. 1993)

## 7.9 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle aufgelistet. Die für diese Arbeit wesentlichen Eigenschaften sind aufgeführt.

Tab. 9: verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektorrückgrat	Passagier-DNA	Referenz
<i>pDisplay</i>	<i>pDisplay</i>		Invitrogen
<i>pGEM-T</i>	<i>pGEM-T</i>		Promega
<i>pSTblue-1</i>	<i>pSTblue-1</i>		Novagen
<i>pL61</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>A. victoria egfp</i> -ORF	Persönliche Mitteilung
<i>pDisplay-egfp</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>A. victoria egfp</i> -ORF	diese Arbeit
<i>pGEM-T-alb-cDNA</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>albumin</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>pGEM-T-β-actin-cDNA</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>β-actin</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>pGEM-T-egfp-cDNA</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>egfp</i> -cDNA	diese Arbeit
<i>pAlb<sup>Pro</sup></i>	<i>pGEM-T</i>	Promotor : -790 bis +15 bp in Bezug auf den Transkriptionsstart des <i>albumin</i> -Gens	diese Arbeit
<i>pAlb<sup>Enh</sup>-10-11</i>	<i>pGEM-T</i>	Enhancer : -11335 bis -9293 bp des <i>albumin</i> -Gens (PCR-Amplifikat <i>P10-SK</i> + <i>P11-SK</i> )	diese Arbeit
<i>pAlb<sup>Enh</sup>-5-6</i>	<i>pGEM-T</i>	Enhancer : -11326 bis -9331 bp des <i>albumin</i> -Gens (PCR-Amplifikat <i>P5-SK</i> + <i>P6-SK</i> ), enthält drei mutierte Basen	diese Arbeit
<i>pAlb<sup>Enh</sup>-5-6-Fus</i>	<i>pAlb<sup>Enh</sup>-5-6</i>	Enhancer : -11326 bis -9331 bp des <i>albumin</i> -Gens  Richtige Sequenz (nach Einklonieren eines <i>NheI-BglII</i> -Fragments aus <i>pAlb<sup>Enh</sup>-10-11</i> )	diese Arbeit
<i>pDisplay-Alb<sup>Enh</sup>-egfp</i>	<i>pDisplay</i>	<i>alb</i> -Enhancer, <i>egfp</i> -Fusionsgen	diese Arbeit
<i>pDisplay-Alb<sup>Enh+Pro</sup>-egfp</i>	<i>pDisplay-Alb<sup>Enh</sup>-egfp</i>	<i>alb</i> -Promotor -790 bis +15 bp in Bezug auf den Transkriptionsstart aus <i>pAlb<sup>Pro</sup></i>	diese Arbeit
<i>pJC13-1</i>	<i>pGEM4-Z</i>	Enhancer, 2 x 2 <i>chicken-β-globin-insulator elements</i> , Reporter gen	Chung et al. (1993)
<i>pINS-1</i>	<i>pJC13-1</i>	2 x 2 <i>chicken-β-globin-insulator elements</i> , Reporter gen	diese Arbeit
<i>pTRANS</i>	<i>pINS-1</i> ohne Reporter gen	<i>NheI-PvuI</i> -Fragment aus <i>pDisplay-Alb<sup>Enh+Pro</sup>-egfp</i>	diese Arbeit
<i>p5'Hom</i>	<i>pGEM-T</i>	1388 bp 5' Homologiebereich <i>albumin</i> -Gen von 125 bp vor Exon 14 bis einschließlich 72 bp des Exon 15 (PCR-Amplifikat: <i>P5-SK</i> + <i>P6SK</i> )	diese Arbeit
<i>pSTblue-5'-int</i>	<i>pSTblue-1</i>	<i>SpeI-DraIII</i> -Fragment des 5'-Homologiebereichs aus <i>p5'Hom</i> in <i>EcoRV</i> -site	diese Arbeit
<i>p5'Hom+X</i>	<i>pGEM-T</i>	Erweiterter 5' Homologiebereich von bp 44 des Exon 13 bis einschließlich 72 bp des Exon 15 (PCR-Amplifikat <i>P28-SK</i> + <i>P45-SK</i> )	diese Arbeit

Tab 9 Fortsetzung: verwendete Plasmide

Bezeichnung	Vektorrückgrat	Passagier-DNA	Referenz
<i>pDisplay-K1</i>	<i>pDisplay-egfp</i>	Zusätzliche MCS in <i>AflIII</i> -site	diese Arbeit
<i>pDisplay-K2</i>	<i>pDisplay-K1</i>	<i>nrf</i> -IRES (183-653 bp)-Element	diese Arbeit
<i>pDisplay-K3</i>	<i>pDisplay-K2</i>	1388 bp 5' Homologiebereich <i>albumin</i> -Gen (von 125 bp vor Exon 14 bis einschließlich 72 bp des Exon 15)	diese Arbeit
<i>pDisplay-K4</i>	<i>pDisplay-K3</i>	<i>neo-loxP<sup>R</sup></i> : Neomycin-Resistenzgen zwischen <i>loxP</i> -sites	diese Arbeit
<i>pDisplay-K5</i>	<i>pDisplay-K4</i>	5612 bp 3' Homologiebereich <i>albumin</i> -Gen (von 1889 bis 7500 bp stromabwärts von Exon 15 des <i>albumin</i> -Gens)	diese Arbeit
<i>pDisplay-K5'</i>	<i>pDisplay-K5</i>	Ohne <i>neo<sup>R</sup></i> -Gen des <i>pDisplay</i> -Ursprungsvektors	diese Arbeit
<i>pDisplay-neo<sup>R</sup>-loxP</i>	<i>pDisplay-K3</i>	<i>neo-loxP<sup>R</sup></i> : Neomycin-Resistenzgen zwischen <i>loxP</i> -sites	diese Arbeit
<i>PIQOR-alb</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>albumin</i> -cDNA, RT-PCR Amplifikat mit Primern: <i>alb for.</i> + <i>alb rev.</i>	Miltenyi Biotec
<i>PIQOR-β-actin</i>	<i>pGEM-T</i>	<i>β-actin</i> -cDNA, RT-PCR Amplifikat mit Primern: <i>β-act for.</i> + <i>β-act rev.</i>	Miltenyi Biotec

## 7.10 Größenstandards

Tab. 10: Verwendete DNA- und Protein-Größenstandards.

Bezeichnung	Fragmentgrößen (kb/kD)
DNA-Standard 1: 1 kb-PLUS-DNA-Ladder™ (Invitrogen)	100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 650 bp, 850 bp, 1000 bp, 1650 bp, 2000 bp, 3000 bp, 4000 bp, 5000 bp, 6000 bp, 7000 bp, 8000 bp, 9000 bp, 10000 bp, 11000 bp, 12000 bp
DNA-Standard 2: GeneRuler™ 100bp DNALadder Plus	100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp, 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp
Protein-Standard 1: MagicMark™ Western Protein Standard (invitrogen)	20 kD, 30 kD, 40 kD, 50 kD, 60 kD, 80 kD, 100 kD, 120 kD
Protein-Standard 2: PAGE-Ruler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas)	11 kD, 17 kD, 24 kD, 33 kD, 40 kD, 55 kD, 72 kD, 100 kD, 130 kD, 170 kD

## 7.11 Primer (Oligodesoxyribonukleotide)

Homologe Oligodesoxyribonukleotidsequenzen wurden aufgrund bekannter Nukleotidsequenzen ermittelt, die in der Internetdatenbank „GenBank<sup>®</sup>“ hinterlegt sind. Die Auswahl der Primersequenzen beruhte möglichst auf den von Innis & Gelfand (1990) beschriebenen Kriterien. Die Schmelztemperatur wurde nach der Wallace-Regel  $T_m = 2 \times \Sigma (A + T) + 4 \times \Sigma (G + C) - 5^\circ\text{C}$  (Sambrook & Russell 2001) bestimmt und für jedes Primerpaar empirisch verifiziert:

**Tab. 11: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide.** nt: Nukleotide, A: PCR zur Amplifikation von Klonierungs-Fragmenten, G: Genotypisierungs-PCR-Analyse; H: Hybridisierung; R: RT-PCR-Analyse; S: Sequenzierung. **BLAU:** Restriktionsschnittstellen.

Name	Sequenz (5' → 3'),	nt, Einsatz	Beschreibung
<i>egfp for.</i>	GACT <b>AGATCT</b> GACATGGTGAGCAAG	25 S, A	<i>egfp</i> -ORF <i>for.</i>
<i>egfp rev.</i>	GATG <b>ACTGCAG</b> CCTTGACAGCTCG	24 S, A	<i>egfp</i> -ORF <i>rev.</i>
<i>T7 short</i>	TAATACGACTCACTATAGGG	20 S	<i>pGEM-T for.</i> , <i>pDisplay for.</i>
<i>T7 long</i>	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	23 S	<i>pGEM-T for.</i> , <i>pDisplay for.</i>
<i>SP6</i>	TATTTAGGTGACACTATAG	19 S	<i>pGEM-T rev.</i>
<i>pDisplay for.</i>	GTTATTGTCTCATGAGCGG	19 S	<i>pDisplay</i> vor CMV <i>for.</i>
<i>BGH</i>	TAGAAGGCACAGTCGAGG	18 S	<i>pDisplay</i> PolyA <i>rev.</i>
<i>P5-SK</i>	<b>CACGTAGT</b> GCTAGCTTCCTTAGCATGACGTTCCA	34 A	<i>albumin</i> Enhancer <i>for.</i>
<i>P6-SK</i>	<b>GGTACC</b> TCCAAGCTGGAGAACGAGTTCAAGC	32 A	<i>albumin</i> Enhancer <i>rev.</i>
<i>P7-SK</i>	<b>GGTACC</b> TTTAGGAACCATGGGGTTGATTTGG	31 A, G	<i>albumin</i> Promotor <i>for.</i>
<i>P8-SK</i>	<b>GGATCC</b> GTTGATAGGAAAGGTGATCTGTGTGC	32 A	<i>albumin</i> Promotor <i>rev.</i>
<i>P10-SK</i>	TTTCTGCCGGCTAGCTTCCTTAGC	24 A	<i>albumin</i> Enhancer <i>for.</i>
<i>P11-SK</i>	AGGTGTCCTCAAAGGTAGGAGAGG	24 A	<i>albumin</i> Enhancer <i>rev.</i>
<i>P13-SK</i>	<b>GATATC</b> AAGCGTGGGCTGTACCTATTTAAGT	31 A	<i>nrf</i> -IRES <i>rev.</i>
<i>P14-SK</i>	GCTTGCTGAAATTGTTTTGC	20 S	<i>albumin</i> Enhancer <i>for.</i>
<i>P15-SK</i>	ATGATTGTCTATGGTCTTTC	20 S	<i>albumin</i> Enhancer <i>rev.</i>
<i>P16-SK</i>	<b>ACTAGT</b> AGAAGTGAATTAAGCAATGCAAGGCA	33 A	<i>albumin</i> 5'-Homologie <i>for.</i>
<i>P18-SK</i>	<b>GCTAGC</b> TTCAGAATTATTGACCTCATACTTCCA	33 A	<i>albumin</i> 3'-Homologie <i>for.</i>
<i>P19-SK</i>	<b>ATCGAT</b> ATAGGTCAAGCAGAGCTACAGCAATG	32 A	<i>albumin</i> 3'-Homologie <i>rev.</i>
<i>P20-SK</i>	CATGTGAATTCGGTCCC GGGACGCTAGCTCAATCGATA	37 H	Polylinker (MCS) für <i>pDisplay</i>
<i>P21-SK</i>	CATGTATCGATTGAGCTAGCGTCCC GGGACCGAATTCA	38 H	Polylinker (MCS) für <i>pDisplay</i>
<i>P22-SK</i>	<b>ACTAGT</b> TCCATTTGACACAACACCTTTGATCT	32 A	<i>nrf</i> -IRES <i>for.</i>
<i>P23-SK</i>	AAGACAATAGCAGGCATGC	19 S	<i>pDisplay</i> BGH <i>for.</i>
<i>P28-SK</i>	<b>ACTAGT</b> CTTAGGGTGTGATTTTACACCAACAG	33 A	<i>albumin</i> 5'-Homologie <i>rev.</i>
<i>P34-SK</i>	AGATGAACTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAGG	30 S, G	<i>egfp</i> -ORF <i>rev.</i>
<i>P45-SK</i>	<b>ACTAGT</b> GAGCAACTGAAGACTGTCATGGATGAC	33 A	erweiterte <i>alb.</i> 5'-Homologie
<i>P47-SK</i>	AGGACTTCACTCTACACC	18 R	<i>cyp7a1</i> <i>for.</i>
<i>P48-SK</i>	GCAGTCGTTACATCATCC	18 R	<i>cyp7a1</i> <i>rev.</i>
<i>β-act for.</i>	CGACAGCAGTTGGTTGGAGC	20 R	<i>β-actin</i> <i>for.</i>
<i>β-act rev.</i>	CTGTACTACTGACTTGAGACC	20 R	<i>β-actin</i> <i>rev.</i>

**Tab. 11 Fortsetzung: Verwendete Oligodesoxyribonukleotide.** nt: Nukleotide, A: PCR zur Amplifikation von Klonierungs-fragmenten, G: Genotypisierungs-PCR-Analyse; H: Hybridisierung; R: RT-PCR-Analyse; S: Sequenzierung.

Name	Sequenz (5' → 3'),	nt	Einsatz	Beschreibung
<i>alb for.</i>	TGCAACACAAAGATGACAACC	21	R	<i>albumin for.</i>
<i>alb rev.</i>	CCAATGCTGACTTTGCAGAA	20	R	<i>albumin rev.</i>
<i>oct4 for.</i>	CGGACCTGGCTAAGCTTCC	19	R	<i>oct4 for.</i>
<i>oct4 rev.</i>	GAGGAGTCCCAGGACATCAA	20	R	<i>oct4 rev.</i>
<i>hnf3β for.</i>	CTGGCAGCTTGCCATGGG	19	R	<i>hnf3β for.</i>
<i>hnf3β rev.</i>	GTGTGGCCCAGCTATTTAGG	20	R	<i>hnf3β rev.</i>
<i>hnf4a rev</i>	CAAGAAGCCATCTAGCAAGC	20	R	<i>hnf4a rev</i>
<i>afp for.</i>	TGGATGTCAGGACAATCTGG	20	R	<i>afp for.</i>
<i>afp rev.</i>	TTTCTCCTCACTGAGCTGGC	20	R	<i>afp rev.</i>
<i>ttr for</i>	TTCACAGCCAATGACTCTGG	20	R	<i>ttr for</i>
<i>ttr rev.</i>	GTGTTAGCAACTCGGGAAGA	20	R	<i>ttr rev.</i>
<i>a1at for*</i>	CAGCTGGGTGCTGCTGATG	19	R	<i>a1at for.</i>
<i>a1at rev.*</i>	TGTCCCTCTCTGGAAACTA	19	R	<i>a1at rev.</i>
<i>pepck1 for.</i>	GCCTCCTCAGCTGCATAAC	19	R	<i>pepck1 for.</i>
<i>pepck1 rev.</i>	CCAGGATCGAAAGCAAGAC	19	R	<i>pepck1 rev.</i>
<i>rps6 for.</i>	GAAGCTGAACATCTCCTTCCC	21	R	<i>rps6 for.</i>
<i>rps6 rev.</i>	GCTTCATGGGAAAACCTTG	19	R	<i>rps6 rev.</i>
<i>clu for.</i>	AAGCCAAGAAGAAGAAAGAGG	21	R	<i>clu for.</i>
<i>clu rev.</i>	TCCAGCAGGGAGTCGATG	18	R	<i>clu rev.</i>
<i>lrat for.</i>	ACATCCTGTTGGCCCTGAC	19	R	<i>lrat for.</i>
<i>lrat rev.</i>	AGTGCTCGCAGTTGTTCCAC	20	R	<i>lrat rev.</i>
<i>ptgs2 for.</i>	TGGTAGCCAGCAAAGCCTAG	20	R	<i>ptgs2 for.</i>
<i>ptgs2 rev.</i>	TGGCATCCAGGCTGAGCTC	19	R	<i>ptgs2 rev.</i>
<i>ifit1 for.</i>	GAGGCCACATTTGAGATG	19	R	<i>ifit1 for.</i>
<i>ifit1 rev.</i>	TAGACTAGCCCAAGAAGGC	19	R	<i>ifit1 rev.</i>
<i>ltbp1 for**.</i>	CTTGGAAGTCTGAGTTCCAC	21	R	<i>ltbp1 for.</i> Exon 27/28
<i>ltbp1 rev.**</i>	TCATCCATATCAAAGCACTG	20	R	<i>ltbp1 rev.</i> Exon 29/30
<i>ltbp1 ex4 for.</i>	TGATTCGGCATGGCCAGAC	19	R	<i>ltbp1 for.</i> Exon 4
<i>ltbp1 ex 6 rev.</i>	CTGGCCACCATTTCATACAC	19	R	<i>ltbp1 rev</i> Exon 6
<i>cmkor1 for.</i>	ACAGCATCAAGGAGTGGCTG	20	R	<i>cmkor1 for.</i>
<i>cmkor1 rev.</i>	GAGTACTTGAAGATGAAGGC	20	R	<i>cmkor1 rev.</i>
<i>hgf for.</i>	CAACGCGGATGGTTTATTAC	20	R	<i>hgf for.</i>
<i>hgf rev.</i>	TGACACCAAGAACCATTCTC	20	R	<i>hgf rev.</i>

\* *a1at for* und *rev.*: zur Amplifikation der Maus-Orthologen *spi-1* bis *spi-5*

\*\* Primer wurden zur Herstellung der Sonde für dem PIQOR™ Immunology Microarray und für semi-quantitative RT-PCR-Analysen verwendet

## 7.12 Medien und Lösungen

Tab. 12: Medien und Lösungen

Bezeichnung	Menge / Vol.	pH	Hersteller
<b>LB-Medium</b>			
SELECT Pepton	10 g		Invitrogen
Hefeextrakt	5 g		Sigma-Aldrich
NaCl	10 g		Merck
H <sub>2</sub> O	ad 1 L	ad pH 7,5	
<b>PBS 10 x</b>			
NaCl	80 g		Merck
KCl	2		Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4		Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4		Merck
H <sub>2</sub> O	ad 1L	ad pH 7,2	
<b>Trypsinlösung</b>			
Trypsin 2,5%	5 mL		Invitrogen
Hühnerserum	5 mL		Sigma-Aldrich
EDTA 0,5M	1,041 mL		Sigma-Aldrich
PBS 1 x	489 mL		Invitrogen

## 7.13 Molekularbiologische Methoden

### 7.13.1 RNA-Präparation

RNA Präparationen wurden mit dem *Nucleo Spin RNA II*-Reagenziensatz von Macherey & Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Präparation von RNA aus kultivierten, adhärenen Zellen erfolgte entweder nach direkter Lyse in den jeweiligen Kulturschalen oder nach vorheriger Ernte und Zellzahlbestimmung. Bei größeren Zellzahlen wurde das Lysat einer 20-sekündigen Scherung im Turrax (IKA) unterzogen, um Viskosität der Suspension zu erniedrigen. Für die Präparation von RNA aus Gewebe wurden etwa 10 mg schwere Gewebstücke verwendet. Durch eine Turrax-Behandlung im Lysispuffer RA1 (Macherey & Nagel) erfolgten der Zellaufschluß und die gDNA-Scherung in einem Schritt.

Zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle wurden 1µl-Aliquots der gereinigten RNAs mit dem NanoDrop photometrisch (NanoDrop Technologies Inc.) vermessen. Die Integrität der RNAs wurde mit Hilfe einer Chip-basierten Kapillarelektrophorese im Agilent-Bioanalytiker analysiert. Das Mengenverhältnis der ribosomalen 28S und 18S RNA dient dabei als Qualitätskriterium zur Beurteilung der RNA-Integrität. Bei nicht-degradierten RNAs ist das Verhältnis 28S- zu 18S-rRNA zwischen von 1,9 und 2,0. Alle verwendeten RNAs wiesen Werte innerhalb dieser Parameter auf.

Zur vollständigen Entfernung von Resten genomischer DNA aus den isolierten RNA-Proben wurden diese – zusätzlich zu dem obligatorischen *DNaseI*-Verdau auf der Präparationssäule – einem DNase-Verdau in Lösung unterzogen. 5 µg RNA wurde dabei für 20 min bei 37°C mit 1 Unit *DNaseI* (Ambion) inkubiert. Nach Inaktivierung der *DNaseI* mit 1 mM EDTA bei 75°C für 10 min wurden die Proben mit dem *RNA-Cleanup-Kit* (Macherey & Nagel) aufgereinigt.

## 7.13.2 DNA-Präparation

### 7.13.2.1 Plasmid-Minipräparation

Plasmid-DNA wurde nach der Methode von Birnboim & Doly (1979) aus Übernachtskulturen transformierter *E. coli*-Stämme mit dem NucleoSpin-Plasmid (Macherey & Nagel) isoliert.

Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde mit Elutionspuffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) von den Säulen eluiert und bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

### 7.13.2.2 Isolierung von genomischer DNA aus Schwanzspitzenbiopsien

Die Isolierung von genomischer DNA (gDNA) aus Schwanzspitzenbiopsien vier Wochen alter Mäuse, erfolgte nach Lyse in 700 µl Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM EDTA pH8, 100 mM NaCl, 1 % SDS) mit 35 µl *Proteinase K* (10 mg/ml). Die Proben wurden mindestens 6 h bei 55°C geschüttelt bis das Gewebe vollständig aufgelöst war. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand in ein neues Gefäß dekantiert und mit 420µl Isopropanol 30 sec über Kopf geschüttelt, um die DNA auszufällen. Nach erneuter Zentrifugation wurde die sedimentierte DNA mit 1 mL 70%igem EtOH gewaschen und anschließend getrocknet. Die DNA wurde in 400 µl TE (pH 8) aufgenommen und mindestens 3 h bei 55°C gelöst.

### 7.13.2.3 Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen

Die Isolierung von genomischer DNA aus ES-Zellen erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Jeweils ein dicht bewachsenes *well* einer 24-*well*-Platte wurde mit PBS gewaschen und mit 700 µl Lysispuffer (s.o.) mit 10 µl *Proteinase K* ÜN bei 37°C oder 55°C inkubiert. Das Zelllysat wurde in Eppendorf-Gefäße überführt und mit 350 µl Isopropanol versetzt, über Kopf geschüttelt und 5 min bei RT zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl Te (pH 8) aufgenommen und ÜN bei 55°C gelöst.

Zur Genotypisierung mittels PCR wurden pro PCR je 100 ng gDNA, für Southern-Blot Analysen je 2,5-7,5 µg gDNA eingesetzt.

### 7.13.3 Radioaktive Markierung von DNA

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden für Southern- und Northern-Blot-Hybridisierungen erfolgte nach Feinberg & Vogelstein (1983, 1984) mit dem *Rediprime DNA labeling system* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers.

Je 50 ng doppelsträngige DNA-Fragmente (PCR-Produkt oder Restriktionsfragment) wurden in einem Volumen von 45 µl 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 2 µl Reaktionsmix vermischt. Anschließend wurden 3 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (30µCi) zugegeben, gut vermischt und für 30-40 min bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung der radioaktiv markierten Sonde erfolgte mit Sephadex-G50-Säulen nach Angaben des Herstellers. Das Säuleneluat wurde 5 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und unmittelbar zur Hybridisierung einer bzw. maximal zweier Blots eingesetzt.

Folgende Sonden wurden verwendet:

**Tab. 13: Sonden für Southern- und Northern-Blot-Hybridisierungen**

Sonde	bp	Ursprungs-DNA	Methode	Anwendung
<i>albumin</i>	383	PIQOR- <i>alb</i> Exons 4-7 des <i>albumin</i> -Gens	PCR	Northern-Blot: Nachweis <i>albumin</i> -RNA
<i>egfp</i>	732	<i>pDisplay-egfp</i> <i>egfp</i> -ORF	Restriktion: <i>BglII-PstI</i>	Southern-Blot: Nachweis <i>pTRANS</i>
<i>5'-ext</i>	462	<i>p5'Hom+X</i> Bereich stromaufwärts der 5'-Homologie	Restriktion: <i>SpeI-NcoI</i>	Southern-Blot: Nachweis <i>gene-targeting</i>
<i>5'-int</i>	509	<i>pSTblue-5'-int</i> Bereich der 5'-Homologie	Restriktion: <i>EcoRI</i>	Southern-Blot: Nachweis <i>gene-targeting</i>

### 7.13.4 Southern- und Northern-Blotting

Zur Genotypisierung von ES-Zellklonen wurden je 2,5 µg gDNA von drei ES-Zell-Klonen vermischt und gemeinsam gespalten. Für Einzelklon-Analysen und zur Genotypisierung von Mäusen wurden bis zu 7,5 µg genomische DNA eingesetzt. Die Restriktionsverdau erfolgte ÜN bei 37°C in einem Volumen von 300 µl mit je 7 U Restriktionsenzym. Zur Reduktion des Probenvolumens wurden die Proben anschließend einer Isopropanol-Fällung unterzogen und die sedimentierte DNA in 20 µl DNA-Probenpuffer suspendiert.

Die DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und durch *Southern*-Transfer auf Membranen übertragen: 0,9 %-ige Agarosegele wurden dazu 45 min in Denaturierungslösung I (0,4 M NaOH, 0,6 M NaCl) und 30 min in Neutralisierungslösung I (1,5 M NaCl, 0,5 M TrisHCl pH 7,5) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden



die DNA Fragmente durch Kapillar-Blotting ÜN auf eine Hybond-XL-Nylon-Membran (GE Healthcare) übertragen, die zuvor durch 1-minütige Inkubation in A. bidest und 15-minütiger Inkubation im Blotting-Puffer (10 x SSC) äquilibriert wurde. Nach Übertragung der DNA wurde die Membran 90 sec mit Denaturierungslösung II (0,4 M NaOH) und 5 min mit Neutralisierungslösung II (2 x SSC, 0,2 M TrisHCl pH 7,5) behandelt. Durch 30-sekündige UV-Licht-Exposition im Stratalinker (Stratagene) wurde die übertragene DNA quervernetzt und auf der Membran fixiert.

Die Hybridisierung der Membranen erfolgte bei 42°C in Glashybridisier-Röhren in einem Hybridisierofen mit Drehrotor. Nach einstündiger Vorhybridisierung in 25 mL Hybridisierlösung (1 M NaCl, 50 % Formamid, 1 % SDS, 1,25 mg denaturierte Lachssperma-DNA) wurde die [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte Sonde hinzugefügt und für weitere 12 h inkubiert.

Zum Abwaschen unspezifisch gebundener Sonden wurden die Membranen dreimal mit Waschlösung (2 x SSC, 1 % SDS) für 30 min bei 65°C inkubiert.

Die Hybridisierung des *Origene-Tissue-Northern-Blots* erfolgte bei 65°C. Nach einstündiger Prähybridisierung in 25 mL Hybridisierlösung (5 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,5 % SDS, 2 mg denaturierte Lachssperma-DNA) wurde die [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte Sonde hinzugefügt und für weitere 12 h inkubiert. Zum Abwaschen unspezifisch gebundener Sonde wurden sechs aufeinander folgende Waschschrte durchgeführt:

2 x 5 min mit 2 x SSC bei 60°C

2x 30 min mit 2 x SSC, 1 % SDS bei 60°C

2 x 30 min mit 0,1 % SSC bei RT

Die Membranen wurden anschließend eingeschweißt, auf einer Phospho-Imager-Platte exponiert und diese mit dem Cyclone-Phospho-Imager (Packard) ausgelesen.

### 7.13.5 Reverse Transkription und RT-PCR

Ausgehend von Gesamt-RNA-Präparationen wurde mit der *Reversen Transkriptase SuperscriptII* die Synthese komplementärer DNA-Stränge (cDNA-Synthese) unter Verwendung von Oligo-dT<sub>12-18</sub>-Primern durchgeführt. RT-Reaktionen wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 1 µg Gesamt-RNA - nach vorheriger *DNAseI*-Behandlung - als Matrize eingesetzt. Im Anschluss an die RT-Reaktion wurde der RNA-Matrizen-Strang durch eine *RNAseH*-Behandlung (Invitrogen) entfernt (20 min, 37°C, 1 U *RNAseH*, Invitrogen).

### Qualitative RT-PCR und semi-quantitative RT-PCR

Anschließende PCR-Reaktionen mit genspezifischen Oligonukleotiden dienten entweder dem qualitativen Nachweis spezifischer Genprodukte oder wurden im Rahmen vergleichender semi-quantitativer RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dabei wurde für jedes Primer-Paar – unter Verwendung einer geeigneten Referenz-cDNA - die minimal erforderliche Zyklenzahl für die PCR-Reaktion ermittelt, die eine ausreichende Detektierbarkeit des Amplifikats im Agarosegel erlaubte. Dadurch wird gewährleistet, dass die Amplifikation nicht in die Sättigungsphase gerät, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen würde. Die PCR-Ansätze hatten ein Volumen von 30  $\mu\text{L}$ , wovon in der Regel 25  $\mu\text{L}$  auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen wurden.

Für die Analyse der Transkripte während der *in-vitro*-Differenzierung wurden zur Herstellung der cDNAs der undifferenzierten und differenzierten ES-Zellen RNAs von je vier unabhängigen Klonen vereint, um eventuelle individuelle Schwankungen der Einzelproben zu vernachlässigen. In diesem Fall wurde die Zyklenzahl der PCR-Reaktion für jedes Gen um einen Zyklus erhöht, 10  $\mu\text{L}$  des Ansatzes der  $\beta$ -actin-Kontrolle aufgetragen, um eine Normierung der aufzutragenden Proben vornehmen zu können. Als Kontrolle wurde wiederum  $\beta$ -actin auf das Folgegel aufgetragen.

#### 7.13.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur Synthese großer Mengen spezifischer DNA-Fragmente mit definierter Länge und Sequenz (Mullis et al. 1986, Saiki et al. 1988). Diese Methode basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines DNA-Fragments, das von zwei Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird. Die Zielsequenz wird dadurch um den Faktor  $2^n$  vermehrt, wobei „n“ gleich der Anzahl der Zyklen ist (Saiki et al. 1988).

Für Standard-PCRs wurde die *Taq-Polymerase* verwendet. Für Fragmente, die zur Klonierung von Expressions- und *targeting*-Vektoren verwendet wurden, wurde der *Elongase-Enzym-Mix* eingesetzt.

Tab. 14: PCR-Standardansätze für die verwendeten DNA-Polymerasen.

	<i>Taq-Polymerase</i>	<i>Elongase-Enzym-Mix</i>
DNA-Matrize	1-100 ng*	1-100 ng*
1. Primer	200 µM	200 µM
2. Primer	200 µM	200 µM
dNTP-Mix (10 mM)	200 µM	200 µM
10 x PCR-Puffer	1 x	1 x
MgCl <sub>2</sub>	1,5 - 2,8 mM	1,5 - 2,0 mM
DNA-Polymerase	1 U	1 µL**
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	ad 30-50 µL	ad 30-50 µL

\* Die Menge der eingesetzten DNA-Matrize war abhängig von der Art der Matrize: Plasmid-DNA 1ng, gDNA 100 ng, cDNA 1/20stel bis 1/50stel des RT-Produkts aus 1µg RNA

\*\* Aktivität (U / µL) des Enzym-Mixes nicht bekannt

Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

**Tab. 15: PCR-Programme für die verwendeten DNA-Polymerasen.** Zur Amplifikation verschiedener DNA-Matrizen wurden jeweils unterschiedliche Temperaturen für die Schritte 2., 3., 6. und 7. gewählt; <sup>1</sup> Verwendung für qualitative und quantitative Analysen; <sup>2</sup> Verwendung zur Amplifikation von Klonierungs-DNA-Fragmenten

	<i>Taq-Polymerase</i> <sup>1</sup>		<i>Elongase-Enzym-Mix</i> <sup>2</sup>	
1. Initialdenaturierung	95 °C	1,30 min	95 °C	1,30 min
2. Primeranlagerung	57 - 63 °C	30 s	50-68 °C	30 s
3. Primer-Extension	72 °C	60 s	68 °C	2 min
4. Denaturierung	94 °C	30 s	94 °C	30 s
5. Zyklen		20-34 x		34 x
6. Primer-Anlagerung	57 - 63 °C	30 s	50-68 °C	30 s
7. Verlängerte Extension	72 °C	5 min	68 °C	5 min
8. Kühlung	10 °C	Pause	10 °C	Pause

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler PTC-225 (MJ Research) durchgeführt. Die für die verschiedenen PCR-Reaktionen gewählten PCR-Parameter sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 16: PCR-Programme für RT-PCR, Genotypisierung und Klonierung

PCR	bp	Primer for.	Primer rev.	c MgCl <sub>2</sub> [mM]	T <sub>A</sub> [°C]	t <sub>Ext</sub> [sec]	Zyklen	Polymerase
<i>egfp</i> -ORF	732	<i>egfp for.</i>	<i>egfp rev</i>	1,5	57	60	35	<i>Elongase</i>
Genotyp. <i>pDisplay-egfp</i>	355	<i>T7 long</i>	<i>P34-SK</i>	1,5	55	30	35	<i>Taq</i>
Genotyp. <i>pTRANS</i>	1131	<i>P7-SK</i>	<i>P34-SK</i>	1,5	63	45	35	<i>Taq</i>
<i>alb</i> -Promotor	823	<i>P7-SK</i>	<i>P8-SK</i>	1,5	68	90	35	<i>Elongase</i>
<i>alb</i> -Enhancer	2042	<i>P10-SK</i>	<i>P11-SK</i>	2,0	68	150	35	<i>Elongase</i>
<i>alb</i> -Enhancer	2002	<i>P5-SK</i>	<i>P6-SK</i>	1,5	68	150	35	<i>Elongase</i>
<i>nrf</i> -IRES	482	<i>P22-SK</i>	<i>P13-SK</i>	2,0	65	60	35	<i>Elongase</i>
<i>alb</i> -5'Homologie	1400	<i>P16-SK</i>	<i>P28-SK</i>	2,0	50	120	35	<i>Elongase</i>
<i>alb</i> -5'Homologie+X	1934	<i>P45-SK</i>	<i>P28-SK</i>	2,8	60	150	35	<i>Taq</i>
<i>alb</i> -3'Homologie	5624	<i>P18-SK</i>	<i>P19-SK</i>	2,0	50	330	35	<i>Elongase</i>
<i>egfp</i>	732	<i>egfp for.</i>	<i>egfp rev</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
$\beta$ -actin	442	$\beta$ -akt for.	$\beta$ -akt rev.	1,5	57	45	25	<i>Taq</i>
albumin	383	<i>alb forw.</i>	<i>alb rev.</i>	1,5	57	45	28	<i>Taq</i>
<i>oct4</i>	305	<i>oct4 forw.</i>	<i>oct4 rev.</i>	1,5	57	45	32	<i>Taq</i>
<i>hnf3<math>\beta</math></i>	280	<i>hnf3<math>\beta</math> for.</i>	<i>hnf3<math>\beta</math> rev.</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>hnf4a</i>	266	<i>hnf4 for.</i>	<i>hnf4a rev</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>afp</i>	220	<i>afp for.</i>	<i>afp rev.</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>ttr</i>	205	<i>ttr for</i>	<i>ttr rev.</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>aat</i>	183	<i>aat for.</i>	<i>aat rev.</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>pepck1</i>	275	<i>pepck1 for.</i>	<i>pepck1 rev.</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>cyp7a1</i>	399	<i>cyp7a1 for.</i>	<i>cyp7a1 rev.</i>	1,5	57	45	35	<i>Taq</i>
<i>rps6</i>	191	<i>rps6 for.</i>	<i>rps6 rev.</i>	1,3	57	30	20	<i>Taq</i>
<i>clu</i>	264	<i>clu for.</i>	<i>clu rev.</i>	1,3	57	30	24	<i>Taq</i>
<i>lrat</i>	264	<i>lrat for.</i>	<i>lrat rev.</i>	1,3	57	30	24	<i>Taq</i>
<i>ptgs2</i>	356	<i>ptgs2 for.</i>	<i>ptgs2 rev.</i>	1,3	57	30	24	<i>Taq</i>
<i>ifit1</i>	336	<i>ifit1 for.</i>	<i>ifit1 rev.</i>	1,3	57	30	27	<i>Taq</i>
<i>ltbp1</i> *	237	<i>ltbp1 for.</i>	<i>ltbp1 rev.</i>	1,3	57	30	27	<i>Taq</i>
<i>ltbp1 Ex-4-6</i> **	349	<i>ltbp1 ex4 for.</i>	<i>ltbp1 ex 6 rev.</i>	1,5	56	30	35	<i>Taq</i>
<i>ltbp1 Ex-4-6 <math>\Delta</math> Ex5</i> **	179	<i>ltbp1 ex4 for.</i>	<i>ltbp1 ex 6 rev.</i>	1,5	56	60	35	<i>Taq</i>
<i>cmkor1</i>	397	<i>cmkor1 for.</i>	<i>cmkor1 rev.</i>	1,3	57	30	27	<i>Taq</i>
<i>hgf</i>	203	<i>hgf for.</i>	<i>hgf rev.</i>	1,3	57	30	27	<i>Taq</i>

\* PCR wurde für semi-quantitative RT-PCR-Analysen verwendet

\*\* PCRs wurde zur Analyse der Exons 4-6 in WT- und KO-Mäusen verwendet

### 7.13.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Bei dieser als „Cycle Sequencing“ bezeichneten Methode handelt es sich um eine zyklische *in-vitro*-Amplifikation der zu sequenzierenden DNA mittels PCR (Murray 1989, Carothers et al. 1989), verbunden mit basenspezifischen Kettenabbrüchen.

Die Sequenzierreaktionen wurden mit dem „ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit“ durchgeführt. Bei dieser Methode wurde ein Gemisch aus 4 fluoreszenzmarkierten ddNTPs, 4 unmarkierten dNTPs und einer speziellen Ampli $Taq$  DNA Polymerase verwendet. Diese DNA Polymerase wurde für „Cycle Sequencing“ mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden bzw. Terminatoren (ddNTPs) entwickelt. Alle vier Sequenzierreaktionen fanden in einem Ansatz statt. Die verwendeten Oligonukleotide sind Tab. 11 aufgeführt. Dabei handelt es sich sowohl um Standard-, als auch um sequenzspezifische Oligonukleotide. Der Sequenzieransatz enthielt 250 bis 500 ng DNA, 1  $\mu$ L Oligonukleotide (10  $\mu$ M), 2 bis 4  $\mu$ L Sequenzier-Mix und wurde mit H<sub>2</sub>O reinst auf 10  $\mu$ L aufgefüllt.

Die folgenden Sequenzierprotokolle wurden verwendet:

**Tab. 17: Standard-Sequenzierprogramm für Plasmid-Sequenzierungen**

	T [°C]	t [sec]
1. Initialdenaturierung	94 °C	120 sec
2. Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Primeranlagerung	50 / 55 °C	20 sec
4. DNA-Neusynthese (Extension)	60 °C	240 sec
5. Schleife: 4. zu 2.		34 x
6. Kühlung	10 °C	Pause

Anschließend wurde die DNA in 96-well-G50-Superfine (GE Healthcare) Platten aufgereinigt: Je 45  $\mu$ L G50-Matrix wurde in 96-well Lochplatten gefüllt, mit 300  $\mu$ L H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> für 3h bei RT inkubiert und durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 910 x g vorbereitet. Die Proben wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> auf 20  $\mu$ L aufgefüllt und auf die Säulen aufgetragen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 910 x g wurden die gereinigten Proben in der *Speedvac* getrocknet und anschließend in 2  $\mu$  Sequenziergel-Laufpuffer (80% Formamid, 10 mg/mL Dextranblau, 5 mM EDTA) aufgenommen.

Die Sequenzierung erfolgte mit einem ABI Prism<sup>TM</sup> 377 DNA Sequencer (PE Applied Biosystems) im Polyacrylamid-Gel.

Die Detektion erfolgt durch einen Laser, der ein Fenster am Ende der Gels während des Laufs abtastet und so die Fluorophore in den Abbruchfragmenten anregt. Die Lichtemission der Fluorophore wird dann von einer Photomultipliereinheit registriert. Diese Rohdaten werden mit einer speziellen Software aufgezeichnet (Sequence Analysis 3.0).

Die Sequenzrohdaten wurden mit verschiedenen Anwendungen des Programmpaketes Lasergene (DNASTAR, London, UK) ausgewertet. Das Programm „Seqman“ diente zur Bearbeitung der Sequenzrohdaten, die dann mit „EditSeq“ in ihre Aminosäuresequenz übersetzt wurden. „MapDraw“ diente zur Darstellung und Restriktionskartierung einzelner DNA-Sequenzen. In „MegAlign“ wurden Sequenzvergleiche durchgeführt.

### 7.13.8 Klonierung

Alle nicht im Detail aufgeführten molekularbiologischen Standardmethoden (DNA-Fällung, Phenol-Chloroform-Extraktion, Restriktionsanalyse, Agarosegelelektrophorese, Anzucht von Bakterienkulturen in Flüssigmedium und auf Agarplatten, usw.) wurden nach (Sambrook & Russell 2001) durchgeführt.

#### 7.13.8.1 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die Reinigung von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem NucleoSpin<sup>®</sup>ExtractII-Kit (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde entweder in TE-Puffer pH 8.0 oder H<sub>2</sub>O reinst aufgenommen.

#### 7.13.8.2 *tailing* von PCR-Amplifikaten

PCR-Amplifikate wurden zunächst in den Klonierungsvektor *pGEM-T* kloniert, der über einen 5'-T-Überhang verfügt. Im Anschluss an die Gelextraktion der PCR-Produkte erfolgte dazu eine *tailing*-Reaktion, durch die jeweils ein A-Nukleotid an die 3'-Enden der Amplifikate angehängt wurde. Die Reaktion erfolgte in folgendem Ansatz: 1 x PCR-Puffer, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50 µM dATP, 0,5 U *Taq*-Polymerase. Teile des Reaktionsansatzes wurden ohne weitere Aufreinigung in Ligationen eingesetzt.

#### 7.13.8.3 Herstellung von DNA-Hybriden zur Generierung eines synthetischen Polylinkers

Zur Einführung neuer Restriktionsschnittstellen in *pDisplay-egfp* wurde ein synthetischer Polylinker in die *AflIII-site* kloniert. Die Herstellung des Polylinkers erfolgte durch Hybridisierung zweier 5'-phosphorylierter, HPLC-gereinigte Oligonukleotide (Metabion), die - mit Ausnahme der jeweils vier ersten Basen - komplementär zueinander sind (Tab. 11, *P20-SK* und *P21-SK*). Der Reaktionsansatz (je 2 µM Oligonukleotid, 1x *Taq*-PCR-Puffer,

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde zunächst für 1 min 30 sec bei 94°C denaturiert und anschließend durch 8 aufeinander folgende Schritte von jeweils für 5 min bei 70°C, 65°C, 60°C, 55°C, 50°C, 40°C, 30°C und 10°C langsam abgekühlt, um eine homologe Hybridisierung der komplementären Sequenzen zu erreichen. Die nicht-homologen 5'-Überhänge waren kompatibel zur *AflIII-site* (ACATGT) in *pDisplay-egfp*. Durch Sequenzierung wurden Plasmide mit der neuen MCS in gewünschter Orientierung identifiziert (*pDisplay-K1*).

#### 7.13.8.4 Dephosphorylierung von Vektoren mit *alkalischer Phosphatase*

Vektoren wurden vor der Ligationsreaktion in der Regel mit *alkalischer Phosphatase* (Roche) dephosphoryliert, um eine unerwünschte Religation des Vektorrückgrats zu vermeiden. Die Dephosphorylierung erfolgte im Anschluss an Restriktionen in 1 x Dephosphorylierungspuffer mit 1 U *alkalischer Phosphatase* für 30 min bei 37°C. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz mit 2 mM EDTA für 10 min bei 65°C inkubiert. Vor der Ligation wurde die DNA mit Isopropanol unter Zusatz von Glykogen gefällt und in  $H_2O_{reinst}$  resuspendiert.

#### 7.13.8.5 Generierung von *blunt-ends* durch *Klenow-Behandlung*

Für die Ligation von nicht-kompatiblen Restriktionsfragmenten mussten deren 3'- bzw. 5'-Überhänge - durch eine Behandlung mit dem *Klenow-Fragment* der *E. coli DNA-Polymerase I* (NEB) – zunächst aufgefüllt (5'-Überhang), bzw. degradiert (3'-Überhang) werden, um *blunt-ends* zu erzeugen. 1 µg DNA wurde mit 33 µM dNTPs, 1 U *Klenow-Enzym* in einem beliebigen Restriktionspuffer (NEB) für 15 min bei 25°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz mit 10 mM EDTA für 20 min bei 75°C inkubiert.

#### 7.13.8.6 Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten wurden mit *T4-DNA-Ligase* (Promega) in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer durchgeführt. Hierbei wurden stöchiometrische Mengen von Vektor- und Passagier-DNA (*insert*) in einem Ligationsansatz eingesetzt. Die Ligation erfolgte mit 10 U Ligase pro µg DNA für 2 – 16 h bei Temperaturen zwischen 14 und 22 °C. Ligationsansätze wurden ohne weitere Reinigung in nachfolgende Transformationen eingesetzt.

#### 7.13.8.7 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Die Transformation von kompetenten DH5α-Zellen (Invitrogen) erfolgte nach Angaben des Herstellers mit 20 bis 100 µL Zellsuspension.

### 7.13.9 Microarray-Analysen

Für die Microarray-Analysen ruhender und aktivierter WT-HSC, sowie aktivierter *Itbp1*-defizienter HSC, wurden pro Experiment die Zellen von jeweils 5 männlichen Tieren präpariert und gemeinsam kultiviert. Nach Präparation, photometrischer Vermessung und Qualitätskontrolle der Gesamt-RNA wurden die Proben einer modifizierten linearen T7-Amplifikation nach Eberwine (1996) unterzogen. Nach photometrischer Vermessung und Qualitätskontrolle der amplifizierten RNA (aRNA) wurden daraus fluoreszenzmarkierte (Cy3/Cy5) cDNAs hergestellt zur Hybridisierung der PIQOR™ Immunology Microarrays (Miltenyi Biotec) verwendet. Jeweils zwei Proben - eine Cy3-markierte und ein Cy5-markierte – wurden nach Aufreinigung, vereint und auf einem Array gemeinsam hybridisiert. Alle Hybridisierungen wurden als Replikat (aktivierte HSC / ruhende HSC) bzw. als Triplikat (WT- / KO-HSC) durchgeführt. PIQOR™ Immunology Microarrays verfügen über 1070 verschiedene cDNA-Sonden muriner Gene, die jeweils als Vierfach-Replikate vorhanden sind.

Alle Schritte zur Herstellung und Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten cDNAs erfolgten nach Angaben des Herstellers und sind im Detail im PIQOR™ Microarray Kit Handbuch aufgeführt, das als pdf-Dokument auf der Internetseite [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com) erhältlich ist.

Nach der Hybridisierung der Microarrays wurden die Fluoreszenz-Signale mit einem Microarray-Scanner (GB2505B Agilent Technologies) bei 50% Laser-Power erfasst. Die Signal-Quantifizierung erfolgte mit der ImaGene Software Version 5.0 (BioDiscovery). Der lokale Hintergrund wurde vom jeweiligen *spot*-Signal abgezogen, um die netto-Signal-Intensitäten zu erhalten aus denen das Verhältnis aus Cy5- und Cy3-Signal berechnet wurde. Anschließend wurden die Mittelwerte der Verhältnisse der vier Replikate pro Gen gebildet. Die mittleren Verhältnisse wurden mit der LOWESS-Methode (*locally weighted linear regression*) normalisiert. Für die Normalisierung wurden nur solche *spots* verwendet, bei denen die netto-Fluoreszenz-Intensität in mindestens einem der beiden Kanäle zweimal höher als das durchschnittliche Hintergrundsignal aller verwendeten (*unflagged*) *spots* war. Zur Beurteilung der Validität und Uniformität der Hybridisierung, wurde für jedes *spot*-Replikat der Variationskoeffizient angegeben (relative Standardabweichung, d.h. die Standardabweichung dividiert durch den Mittelwert). Es wurden nur Expressionsverhältnisse für Gene dargestellt, bei denen mindestens zwei der vier *spot*-Replikate den Qualitätskriterien entsprachen.

Die angegebenen Expressions-Verhältnisse stellen den Mittelwert aus jeweils zwei bzw. drei Hybridisierungen dar (s. o.). Die Rohdaten und prozessierten Daten aller Einzelexperimente wurden gemeinsam mit einer detaillierten Beschreibung der Experiment-Serie in der NCBI-Datenbank GEO ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) hinterlegt und sind unter der Zugriffsnummer GSE5670 abrufbar.



## 7.14 Proteinchemische Methoden

### 7.14.1 Protein-Präparation

Zum Nachweis von EGFP in transfizierten Zellen und im Lebergewebe transgener Mäuse wurden Protein-Präparationen hergestellt. Zellen wurden direkt in der Kulturschale mit WP1-Puffer (RIPA-Puffer: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-Desoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-Cl pH 8,0) lysiert. Zur Inhibierung von Proteasen wurden pro 10 mL Lysispuffer eine Tablette *complete*-Potease-Inhibitor-Cocktail (Roche) zugesetzt. Jeweils 40 mg Lebergewebe und zwischen  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 1 mL WP1 lysiert und durch 10-20 sec. Turrax-Behandlung unter Kühlung homogenisiert.

Protein-Lysate wurden nach Proteinkonzentrationsbestimmung für Immunpräzipitations-Western-Blot-Analysen eingesetzt.

### 7.14.2 Bestimmung von Protein-Konzentration

Die Bestimmung der Proteinmenge in Aliquots von Protein-Lysaten erfolgte mit Hilfe des *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kits* (Pierce), in Anlehnung an die Biuret-Methode (Kekki & Siltanen 1960), nach Angaben des Herstellers. Zur Kalibrierung dienten BSA-Lösungen definierter Konzentration. Die Analyse erfolgte in 96-well-Platten in einem *Genios-multi-plate*-Reader (Tekan).

### 7.14.3 Immunpräzipitation

Mit Hilfe des *μMACS GFP Isolation Kit* (Miltenyi Biotec) wurde EGFP aus Protein-Lysaten transgener Zellen und Mäuse angereichert. Somit konnte die Sensitivität für die nachfolgende Western-Blot-Analysen erhöht werden, da mit dem vorgeschalteten IP-Schritt das EGFP aus bis zu ca. 600 μg Protein-Lysat angereichert werden konnte. Die IP-Experimente erfolgten entsprechend den Angaben des Herstellers.

Die Methode folgt folgendem Prinzip: Anti-GFP-Antikörper, die an 50 μm große superparamagnetische Partikel konjugiert sind, werden mit Protein-Lysat inkubiert und binden darin gelöstes GFP oder EGFP. Die Lösung wird auf eine mit Lysispuffer äquilibrierte μMACS-Säule (Miltenyi Biotec) im magnetischen Feld aufgebracht, wodurch die magnetischen Partikel samt gebundenem EGFP auf der Säule immobilisiert werden. Nach mehrfachem Waschen wird das gebundene EGFP mit 95°C warmen SDS-Laufpuffer (Laemmli 1970) durch Aufbrechen der Antigen-Antikörper-Interaktion von der Säule eluiert.

#### 7.14.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (PAGE)

Nach erfolgter Immunpräzipitation (IP) wurden die angereicherten Proteine per Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. 50% des IP-Eluats (15 bis 20  $\mu\text{L}$ ) wurden zur Analyse eingesetzt. Als Größenstandards wurden jeweils 5  $\mu\text{L}$  der *PAGE-Ruler<sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder (Fermentas)* oder des *MagicMark<sup>TM</sup> Western Protein Standard (Invitrogen)* verwendet.

Die Auftrennung erfolgte in 10-20%igen Tris-Glycin Fertiggelen (Novex / Invitrogen) bei einer Spannung von 200 V und einer Stromstärke von 50 bis 100 mA (10 Watt bis max. 20W). Als Laufpuffer diente 25 mM Tris, 192,1 mM Glycin, 3,46 mM SDS.

#### 7.14.5 Western-Blotting

Durch Western-Blotting (Towbin et al. 1979) wurden die in der PAGE aufgetrennten Proteine in einer *Trans-Blot SD SemiDry Transfer Cell* (BioRad) im elektrischen Feld auf eine PVDF Membran übertragen (Hybond-P, GE Healthcare). Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Tränken in Methanol aktiviert. Das Gel wurde für 15 min im Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 13 mM SDS, 20% Methanol) äquilibriert. Zwei Blot-Papiere (BioRad) wurden ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Dann wurde in der Blot-Kammer übereinander ein Blot-Papier, das Gel, die Membran und ein weiteres Blot-Papier luftblasenfrei geschichtet. Der Transfer erfolgte für 35 min bei 50 V und 100 mA (5W).

Anschließend wurde die Membran ÜN bei 4°C mit Blockierungslösung (5% Magermilchpulver, 0,1% Tween in PBS) inkubiert. Zur Detektion von EGFP wurde ein im Verhältnis 1 zu 10.000 verdünnter anti-GFP-HRP-Antikörper (Miltényi Biotec) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter leichtem Schütteln in Blockierungslösung. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (0,5% Magermilchpulver, 0,1% Tween in PBS) für jeweils 5 min wurde die Membran in Folie eingeschlagen und die Färbereaktion mit dem ECL+-Kit (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die Membran für 5 min bis zu mehrere Stunden in einer Fotokassette auf Fotofilm (Kodak) exponiert, um die durch die enzymatische Reaktion verursachte Chemiluminiszenz zu detektieren. Die Filme wurden zur Entwicklung nacheinander für 1 min in Entwicklerlösung (Kodak), kurz in H<sub>2</sub>O und für eine weitere Minute in Fixierlösung (Kodak) getaucht.

### 7.14.6 Herstellung von Antikörper-Allophycocyanin-(APC)-Konjugaten

Für die Konjugation von APC an Antikörper werden beide Reaktionspartner zuvor über Amine derivatisiert. Am APC werden Maleimid- und am Antikörper Thiolgruppen eingeführt. In der eigentlichen Kopplungsreaktion reagieren Maleimide mit protonierten Sulfhydrylgruppen unter Bildung stabiler Thioetherbindungen. Um eine Hydrolyse der Maleimide zu vermeiden und die Thiole in reduziertem Zustand zu stabilisieren, findet die Reaktion bei pH 6-7 statt (Smyth et al. 1964). Um ein Ausbleichen der Fluorochrome und deren Konjugate zu vermeiden, müssen diese vor Lichteinstrahlung geschützt werden und können für immunhistologische (Osborn & Weber 1982) und durchflusszytometrische (Ormerod et al. 1990) Untersuchungen eingesetzt werden.

1 mg Antikörper gelöst in PBS/EDTA/Natriumazid (s. u.) wurde auf 250 µl mit MES-Puffer (s. u.) aufgefüllt. Bei größeren Volumina als 200 µl muss das zugegebene MES-Volumen mindestens 20% des Endvolumens betragen. Dann wurde 2 µl 1 M DTT pro 100 µl Ansatz zugegeben und 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Eine NAP10-Gelfiltrationssäule wurde mit entgastem APC-Kopplungspuffer (s. u.) äquilibriert. Über diese Säule wurde der reduzierte Antikörper in APC-Kopplungspuffer umgepuffert und in 250 µl Fraktionen gesammelt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch eine Coomassie-Proteinfärbung identifiziert und vereinigt. Die Färbung erfolgte, indem zu 10 µl Probe 30 µl Coomassielösung (Pierce) zugegeben wurden. Proteinhaltige Fraktionen färbten sich dabei blau. Die Proteinkonzentration wurde durch die Bestimmung der Extinktion bei 280nm nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Konz. (mg/ml)} = \text{OD}_{280} \times 0,7 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Um die Anzahl der freien Sulfhydrylgruppen pro Antikörpermolekül zu ermitteln, wurden zu der Nullprobe und reduziertem Antikörper ( $V=100\mu\text{l}$ ) 5µl Ellmann`s Reagenz (Fluka, 10mM in PBS/EDTA) gegeben und die Extinktion bei 412 nm nach 5 min gemessen. Die Anzahl der Sulfhydrylgruppen pro Antikörper-Molekül wurde dann mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Thiole/Antikörper} = 15,3 \times \text{OD}_{412} / \text{OD}_{280}$$

1,8 mg APC wurden am Vortag abzentrifugiert (15 min bei 13000 x g und RT), dem Ausgangsvolumen gleich mit APC-Kopplungspuffer resuspendiert und anschließend ÜN gegen 1 x APC-Kopplungspuffer dialysiert.

Die Konzentration von APC wurde durch Messung der Extinktion bei 652nm bestimmt:

$$\text{Konz. von APC} = \text{OD}_{652} \times \text{Verdünnungsfaktor} / 5,9 \text{ (Soll 6mg/ml)}$$

Anschließend wurden pro mg APC 16 µg SMCC (10 mg/ml im DMSO, Merck) zugegeben (molares Verhältnis 5:1) und 1 h im Dunkeln bei RT geschüttelt. Um das SMCC zu entfernen,

wurde das APC über eine PD10-Gelfiltrationssäule in APC-Kopplungspuffer umgepuffert. Die Konzentration des SMCC-aktivierten APCs wurde nach der oben angegebenen Formel bestimmt und 1,38 mg aktiviertes APC pro mg reduzierten Antikörper für die Kopplung eingesetzt (molares Verhältnis 2:1). Die Kopplungsreaktion dauerte 1 h und verlief unter langsamer Rotation in Dunkeln bei RT. Sie wurde mit 2 µl 50 mM β-Mercaptoethanol und 34 µl 100 mM N-Ethylmaleimid (Sigma-Aldrich) pro mg eingesetztes APC (jeweilige Inkubation: 20 Minuten bei RT) gestoppt. Das Konjugat wurde über eine PD10-Gelfiltrationssäule in PBS/EDTA/Natriumazid umgepuffert und die blauen Fraktionen gesammelt. Nach Größenfraktionierung des Konjugates (Superdex 200 16/60 Säule von GE Healthcare) und anschließender Konzentrationsbestimmung der einzelnen Fraktionen konnten diese in Immunmarkierungen getestet werden.

#### **PBS/EDTA/Natriumazid**

PBS 10 x	1 x	
EDTA	50 mM	Sigma-Aldrich
Natriumazid	0,05 %	Sigma-Aldrich

#### **MES-Puffer**

MES	8 mM	Merck
EDTA	0,2 mM	Sigma-Aldrich
	ad pH 6.0	

#### **APC-Kopplungspuffer**

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100 mM	Merck
NaCl	50 mM	Merck
EDTA	1 mM	Sigma-Aldrich
	ad pH 6,8	

### **7.14.7 Immunfluoreszenz**

Anti-GFAP-Immunmarkierungen von HSC erfolgten einen Tag nach Ausaat auf *chamber slides* (Lab-Tek™). Die Antikörper-Inkubationen und die Kernfärbung erfolgten in einem Volumen von 100 µL, Waschschrte in einem Volumen von 50 mL.

1. 3 x 2 min Inkubation in Waschpuffer (PBS Tween 0,05%, pH 7,2) bei RT
2. 30 min Inkubation in Ziegen-Serum-Blockierungs-Lösung bei RT
3. Inkubation mit 87µg/mL Kaninchen-anti-GFAP (Sigma-Aldrich G9269) oder als Kontrolle mit 87µg/mL Kaninchen-IgG-Fraktion (Santa Cruz, SC-2027) in AK-Inkubationspuffer-I (s. u.) für 1h bei RT
4. 3 x 2 min Inkubation in Waschpuffer bei RT
5. Inkubation mit 10µg/mL Ziege-anti-Kaninchen-FITC (Mol Probes F2765) in AK-Inkubationspuffer-II (s. u.) für 30 min bei RT im Dunkeln
6. 3 x 2 min Inkubation in Waschpuffer bei RT im Dunkeln
7. 15 min Inkubation mit PI-Kernfärbelösung (s. u.) bei RT im Dunkeln
8. 3 x 2 min Inkubation in Waschpuffer bei RT im Dunkeln
9. in Wasser dippen und mit Gelmount (Biomedica) + 50 mg/mL DABCO (FLUKA) eindecken
10. nach 1h mit Nagellack versiegeln

**Ziegen-Serum-Blockierungs-Lösung**

BSA	1%	Serva
Ziegen-Serum	2%	Santa Cruz
<i>Cold Fish Skin Gelatine</i>	0,1%	Sigma-Aldrich
Natriumazid	0,05%	Sigma-Aldrich
Triton X-100	0,1%	Sigma-Aldrich
Tween 20	0,05%	BioRad

**AK-Inkubationspuffer-I**

BSA	1%	Serva
<i>Cold Fish Skin Gelatine</i>	0,1%	Sigma-Aldrich
Natriumazid	0,05%	Sigma-Aldrich
PBS pH 7,2	0,01M	
	H <sub>2</sub> O	

**AK-Inkubationspuffer-II**

Natriumazid	0,05%	Merck
PBS pH 7,2	0,01M	
	H <sub>2</sub> O	

**PI-Kernfärbelösung**

RNAseA	10 µg/ml	Roche
PI	2 µg/ml*	Sigma-Aldrich

**7.15 Zellbiologische Methoden:****7.15.1 Kultivierung von HEPA 1-6-Zellen**

Die Kultivierung von HEPA 1-6-Zellen erfolgte in 90% Dulbecco's MEM (4.5 g/L Glukose) + 10% FCS + 1 x Pen/Strep bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Semi-konfluente Zellen wurden nach Trypsinisierung im Verhältnis 1 zu 4 bis 1 zu 8 subkultiviert. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium (70% Medium, 20% FCS, 20% DMSO) in einem Einfriercontainer (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren und für Langzeitlagerung 24 h später in Flüssigstickstoff überführt.

**7.15.2 Kultivierung und Transdifferenzierung von HSC**

HSC wurden nach der Präparation aus C57BL/6 Mäusen auf unbeschichtete Zellkulturschalen ausgesät und in 90% Dulbecco's MEM (4.5 g/L Glukose, 2mM Glutamin) + 10% FCS + 1 x Pen/Strep bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Zellen wurden entweder einen Tag kultiviert (ruhende HSC) oder für sechs Tage kultiviert (aktivierte / transdifferenzierte HSC). Die Reinheit der HSC Präparationen wurde durch Immunfärbungen mit anti-GFAP-Antikörpern ermittelt.

### 7.15.3 Kultivierung von R1-ES-Zellen

Die Kultivierung der ES-Zelllinie R1 erfolgte auf neomycinresistenten, mitoseinaktivierten embryonalen Fibroblasten (MEF,  $3-5 \times 10^6$  / 100 mm Kulturschale) in H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit R1-ES-Zell-Medium (s. u.). Semi-konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1 zu 2 bis 1 zu 8 subkultiviert (alle 2 bis 3 Tage). Die Vereinzelnung der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Trypsinisierung (. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium (70% Medium, 10% FCS, 10% NCS, 10% DMSO) in einem Einfriercontainer (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren und für Langzeitlagerung 24 h später in Flüssigstickstoff überführt.

#### R1-ES-Kultur-Medium

DMEM	440 mL		Invitrogen
FCS (S1820-S04789)	83 mL	15 %	Biowest
L-Glutamin (200 mM)	5,5 mL	2 mM	Invitrogen
Pen/Strep (100x)	5,5 mL	1x	Invitrogen
HEPES	13,75 mL	25 mM	Invitrogen
MTG (30 mM)	5,5 mL	300 µM	Sigma-Aldrich
LIF (ESGRO)	$5,7 \times 10^5$ U	1000 U/mL	Chemicon

### 7.15.4 Kultivierung von HM1-ES-Zellen

Die Kultivierung von HM1-ES-Zellen erfolgte in HM1-ES-Kulturmedium (s. u.) in H<sub>2</sub>O gesättigter Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> in mit Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen ohne embryonale Maus-Fibroblasten (MEF). Die Beschichtung erfolgte mit 0,1% Gelatine Typ A (aus Schweinehaut, G-2500 Sigma). Semi-konfluente Zellen wurden im Verhältnis 1 zu 2 bis 1 zu 8 subkultiviert (alle 2 bis 3 Tage). Die Vereinzelnung der Zellen erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS durch Trypsinisierung (. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in Einfriermedium (70% Medium, 10% FCS, 10% NCS, 10% DMSO) in einem *Cryo 1°C*-Einfriercontainer (Nalgene) bei -80°C langsam eingefroren und für Langzeitlagerung 24 h später in Flüssigstickstoff überführt.

#### HM1-ES-Kultur-Medium

GMEM	500 mL		Invitrogen
Na-Pyruvat 100mM	5,7 mL	1 mM	Invitrogen
NEA (100x)	5,7 mL	1x	Invitrogen
FCS (S1820-S04789)	28,5 mL	5%	Biowest
NCS (S0003-2030603)	28,5 mL	5%	Harlan Sera-Lab
LIF (ESGRO)	$5,7 \times 10^5$ U	1000 U/mL	Chemicon
β-Mercaptoethanol (100 mM)	0,57 ml	100 µM	Sigma-Aldrich
Pen/Strep (100x)	2,8 mL	1x	Invitrogen

### 7.15.5 Generierung transgener Zelllinien durch Elektroporation

Zur Herstellung transgener Zelllinien wurden jeweils  $10^7$  ES-Zellen ( $0,3 \times 10^7$  HEPA 1-6-Zellen) mit 10-20  $\mu\text{g}$  linearisierter und Phenol-Chloroform-extrahierter Vektor-DNA in 750  $\mu\text{L}$  PBS suspendiert und in einer Elektroporationsküvette (BioRad, Typ 165-2107) im *Gene Pulser* (BioRad) durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke transfiziert. Folgende Geräteeinstellungen wurden gewählt:

ES-Zellen: 200 V 400  $\mu\text{F}$

HEPA 1-6-Zellen: 180 V 850  $\mu\text{F}$

Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 50 mL Medium suspendiert und auf fünf 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. 24 h Stunden später wurde mit der G418-Selektion begonnen. In Abhängigkeit der Aktivität der jeweiligen G418-Charge (Invitrogen) wurde dem Medium zwischen 200 und 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ES-Zellen) bzw. 1000  $\mu\text{g}$  G418 (HEPA 1-6-Zellen) zugesetzt. Medienwechsel erfolgten zunächst täglich, nach vier Tagen zweitägig. Nach 9-11 tägiger Selektion wurden Einzelkolonien unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Eppendorf-Pipette abgelöst, 5 min in einer 1:1 mit PBS verdünnten Trypsinlösung (Tab. 12) bei RT inkubiert, und in 96-well Schalen mit normalem Kulturmedium ausgesät. Nach weiterer Expansion standen nach ca. 1-2 Wochen genügend Zellen für Kryokonservierung und DNA-Präparation zur Verfügung.

#### 7.15.5.1 *in-vitro*-Differenzierung von HM1-ES-Zellen zu Hepatozyten

Die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Hepatozyten erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Kubo et al. (2004). Folgendes Standardprotokoll wurde etabliert:

Exponentiell wachsende, pluripotente HM1-ES-Zellen, die in HM1-ES-Kulturmedium mit LIF kultiviert wurden, wurden durch Trypsinisierung geerntet und zweimal mit PBS gewaschen.

Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen in einer Konzentration von  $10^4$  Zellen/ml im Differenzierungsmedium K-I (s. u.) suspendiert, das 15% FCS enthielt. Die Zellen wurden für 2,5 Tage in Petri-Schalen inkubiert, auf denen ES-Zellen nicht adhären können. Als Folge entstand eine Suspensions-Kultur, in der die ES-Zellen Zellaggregate bildeten, die als *embryoid bodies* (EBs) bezeichnet werden. Nach 2,5 Tagen waren die EBs bereits deutlich mit bloßem Auge sichtbar und konnten durch Sedimentation in 15 mL Falcon Röhrchen geerntet werden.

Es folgten weitere 3,5 Tage Inkubation in Suspensionskultur (auf Petri-Schalen) im Serum-freien Differenzierungsmedium KII (s. u.). Medienwechsel erfolgten täglich. Dazu wurden die EBs durch eine gleichmäßige Drehbewegung der Petri-Schalen im Zentrum der Schalen

versammelt. Das alte Medium konnte daraufhin vorsichtig vom Rand her abgesaugt und durch neues Medium ersetzt werden.

An Tag 6 wurden die EBs schließlich in mit Matrigel beschichteten Zellkultur-Schalen ausgesät. Die Schalen wurden dazu für eine Stunde mit einer 5%igen Matrigel-Lösung (BD) in IMDM bei RT inkubiert. Nach Absaugen der Beschichtungslösung, wurden ca. 20 bis 25 EBs pro 6-well-Schale in Differenzierungsmedium KIII (s. u.) ausgesät und durch vorsichtige Schwenkbewegungen gleichmäßig darin verteilt. Ca. 70% der EBs adhärten im Folgenden. Nicht-adhärenente EBs wurden beim ersten Mediumwechsel am Folgetag entfernt. Medienwechsel erfolgten fortan zweitägig. Aus den adhärenente EBs wanderten die differenzierenden Zellen aus und füllten im Laufe der Kultivierungsdauer von insgesamt 15 bis 25 Tagen nahezu alle Zwischenräume zwischen benachbarten EBs aus. Alternativ wurden die EBs für mikroskopische Aufnahmen auf mit Matrigel beschichteten Deckgläschen ausgesät.

#### Differenzierungsmedium K-I

IMDM	39,425 mL		Invitrogen
Pen/Strep (100x)	0,25 mL	0,5x	Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)*	0,1 mL	2 mM	Invitrogen
Ascorbinsäure (500 mM)	0,05 mL	0,5 mM	Sigma-Aldrich
MTG (300 mM)	0,075 mL	0,45 mM	Sigma-Aldrich
FCS (S1820-S04789)	7,5 mL	15%	Biowest
Protein free hybridoma medium (PFHM-II)	2,5 mL	5%	Invitrogen
Transferrin (25 mg/ml)	0,1 mL	50 µg/ml	Invitrogen

#### Differenzierungsmedium K-II

IMDM	42,045 mL		Invitrogen
Pen/Strep (100x)	0,25 mL	0,5x	Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)	0,08 mL	2 mM	Invitrogen
Ascorbinsäure (500 mM)	0,05 mL	0,5 mM	Sigma-Aldrich
MTG (300 mM)	0,075 mL	0,45 mM	Sigma-Aldrich
KO-Serum-Replacement	7,5 mL	15%	Invitrogen

#### Differenzierungsmedium K-III

IMDM	41,945 mL		Invitrogen
Pen/Strep (100x)	0,25 mL	0,5x	Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)	0,08 mL	2 mM	Invitrogen
Ascorbinsäure (500 mM)	0,05 mL	0,5 mM	Sigma-Aldrich
MTG (300 mM)	0,075 mL	0,45 mM	Sigma-Aldrich
FCS (S1820-S04789)	7,5 mL	15%	Biowest
Dexamethason (50 µM)	0,1 mL	100 nM	Sigma-Aldrich

### 7.15.5.2 Präparation von HSC

Die Präparation von HSC erfolgte durch eine *in-situ*-Perfusion der Leber mit *Collagenase* und *Pronase* nach einem abgewandelten Protokoll von de Leeuw et al. (1984). Die Anästhesie der Mäuse erfolgte mit Ketamin/Xylazin (100 mg/Kg KG Ketamin/2 mg/Kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich). Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und die große Körperhöhlevene (*Vena cava inferior*) und die Pfortader (*vena portae*) freipräpariert. In



Letztere wurde eine Kanüle (26G ½“, kurz, Braun) eingeführt, mit einer Bulldog-Klemme fixiert und mit dem Perfusionsschlauchsystem verbunden. Dann wurde die Perfusion gestartet und gleichzeitig die *Vena cava inferior* durchtrennt, um ein Abfließen des Blutes und der Perfusionslösungen zu ermöglichen. Die Perfusion erfolgte mit einer Flussrate von 6,5 mL/min mit 37°C warmen Lösungen. Die Leber wurde für 5 min mit SC-1 (s. u.), 4,5 min mit SC-2 mit 0,5 mg/mL *Pronase E* (Merck) und 4,5 min mit SC-2 mit 0,25 mg/mL *Kollagenase P* (Roche) perfundiert. Nach der Perfusion wurde das Gewebe in SC-2 mit 1 mg/mL *Kollagenase P*, 1 mg/mL *Pronase E* und 40 µg *DNase I* (Roche) für 20 min bei 37° C weiter verdaut bis die Lösung einen pH zwischen 7,2 und 7,4 erreichte. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nygonsieb filtriert, bei 500 x g pelletiert, in GBSS-B (s. u.) resuspendiert, nochmals pelletiert und anschließend über einen 8%-Nycodenz-Gradient (Axis-ShieldPoC) durch Zentrifugation bei 1500 x g aufgereinigt. Die oberste Zellphase mit den lipidhaltigen HSC wurde mit einer Spritze abgenommen, gewaschen und zur Kultivierung ausgesät.

	SC-1	SC2	GBSS-B
NaCl	1600 mg	1600 mg	8000 mg
KCl	800 mg	800 mg	370 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	156 mg	156 mg	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	302 mg	302 mg	75 mg
HEPES	4760 mg	4760 mg	
NaHCO <sub>3</sub>	700 mg	700 mg	227 mg
EGTA	380 mg		
Glukose	1800 mg		991 mg
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O		1120 mg	225 mg
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O			210 mg
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O			70 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			30 mg
Phenol-Rot	12 mg	12 mg	6 mg

bei allen Puffern anschließend einen pH zwischen 7,2 und 7,4 mit 10M NaOH einstellen

## 7.16 Gallengangsligatur

Eine Ligatur des Hauptgallengangs führt bei Mäusen zur Induktion einer Leber-Fibrose und wird neben der Intoxikation durch CCl<sub>4</sub> als experimentelles Modell verwendet.

Vier männliche WT und drei männliche *Itbp1*-KO-Mäuse wurden der Operation unterzogen. Die Mäuse wurden mit Ketamin/Xylazin (100 mg/Kg KG Ketamin/2 mg/Kg KG Xylazin, Sigma-Aldrich) narkotisiert und der Bauchraum geöffnet. Die Leber wurde leicht nach oben Richtung Zwerchfell geschoben und der Gallengang mit einer spitzen Pinzette von der Pfortader leicht abgelöst, und ein Ligationsfaden (Synthofil USP5/0, Braun) um den Gallengang geführt. Daraufhin wurden zwei aufeinander folgende Ligaturknoten geknüpft, um den Gallengang sicher zu verschließen. Der Bauchraum wurde mit einem Operationsfaden (Cardiofil USP3/0, Braun-Dexon) vernäht. Als Analgetikum wurde postoperativ einmalig 9 µL Buprenorphin-HCL-Lösung (Temgesic®, Essex-Pharma)

subkutan verabreicht. 4 Wochen nach der Operation wurden die Mäuse getötet und Blut für Serum-Analysen entnommen. Leberstücke wurden für histologische Untersuchungen entnommen und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Die Bestimmung der Blutparameter Bilrubin, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) erfolgte mit Standard-Enzymtests im Klinisch-Chemischen Zentrallabor der Universitätsklinik der RWTH Aachen. Alle Tierexperimente erfolgten mit Genehmigung der Bezirksregierung Köln.

### 7.17 Gewebsschnitte

Kryoschnitte von Lebergewebe wurden in einer Schnittdicke von 7  $\mu\text{m}$  mit dem Kryostat HM 560, Cryo Star (MICROM) hergestellt.

Parafinschnitte von Lebergewebe wurden in einer Schnittdicke von 1,5  $\mu\text{m}$  mit dem Rotatinsmikrotom RM 2145 (Leica) hergestellt.

### 7.18 Sirius-Rot-Färbungen

Sirius-Rot-Färbungen wurden zum Anfärben von fibrillärem Kollagen (Kollagen I und III) in Parafin-Schnitten der Leber durchgeführt. Dazu wurden die Parafin-Schnitte zunächst in Xylol (Merck) für 40 min bei 60°C entparafiniert und anschließend in einer absteigenden Alkohol-Reihe (100% 2 min, 100% 2 min, 96% 1 min, 70 % 1min) hydratisiert und schließlich in einer Küvette fließend gewässert. Anschließend wurden die Schnitte für eine Stunde in Sirius-Rot-Färbelösung (s. u.) und für 2 min in 0,01 N Salzsäurelösung (Merck) inkubiert. Nach Spülen mit Leitungswasser in einer Küvette wurden die Probe durch eine aufsteigende Alkoholreihe (s. o.) dehydratisiert, in Xylol überführt und in DPX Moutant (Fluka) eingedeckt.

#### Sirius-Rot Färbelösung

0,1 g Sirius-Rot (Polysciences Inc.) in 100 mL Pikrinsäure (wässrig, kalt, gesättigt, Apotheke des Universitätsklinikums, RWTH Aachen) lösen und mit 2N Natronlauge (Merck) auf pH 2 einstellen.

### 7.19 Mikroskopische Verfahren

Für mikroskopische Aufnahmen wurden Zellen auf Deckgläschen kultiviert, die zuvor durch Ausglühen sterilisiert und in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp beschichtet wurden (ES-Zellen 0,1% Gelatine, *in-vitro*-Differenzierungskulturen 5% Matrigel). Die Deckgläschen wurden in Gelmount (Biomed) mit DABCO (50 mg/mL) eingedeckt.

### 7.19.1.1 Laser-Scan-Mikroskopie (LSM)

Fluoreszenz-Schichtaufnahmen wurden am LSM 510 (Carl Zeiss) aufgenommen. Das Mikroskop verfügt über einen Argon und einen Helium/Neon Misch-Gas-Laser mit Excitationswellenlängen von 488 nm. Laser-Scan-Aufnahmen wurden in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln aufgenommen (line-averaging mode, Pinhole: 96  $\mu\text{m}$ ). Die Bildverarbeitung und Speicherung erfolgte mit dem Zeiss LSM Image Browser Version 3.1.

### 7.19.1.2 Epifluoreszenz-Mikroskopie

Epifluoreszenz- und Durchlichtaufnahmen wurden mit dem Axioskop 2+ aufgenommen. Als Lichtquelle dient eine Helium-Dampflampe (EBQ 100 – HBO 100). Folgende Filtersätze wurden verwendet:

**Tab. 18: Verwendete Filtersätze für die Epifluoreszenz-Mikroskopie.**

Fluorophor	Exzitation	Strahlteiler	Emission
EGFP/FITC	BP 470/40	FT 495	BP 525/50
PI	BP 546/12	FT 580	LP 590

Bilder wurden in einer Auflösung von 1024 x 1024 Pixeln aufgenommen und mit dem Programm AxioVision 3.1 verarbeitet.

## 7.20 Immunmarkierung von Zellen für MACS und FACS

Durch Immunmarkierung mit fluorophor- oder chromogenkonjugierten Antikörpern können Zellen spezifisch angefärbt werden und im Durchflusszytometer untersucht werden. Antikörper, die an magnetische Partikel (*magnetic beads*) gekoppelt sind, können zur Anreicherung damit markierter Zellen genutzt werden (magnetische Zellseparation, MACS, Abts et al. (1989), Miltenyi et al. (1990)).

Das Prinzip der Immunmarkierungen ist für beide Methoden identisch. Werden lebende Zellen verwendet, lassen sich ausschließlich deren Oberflächenproteine markieren. Sollen intrazelluläre Markierungen erfolgen, müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden, um den Antikörpern den Zugang ins Zytoplasma zu ermöglichen. Grundsätzlich können Direktkonjugate aus Antikörper und fluoreszenter Gruppe (bzw. *magnetic bead*) oder - wenn keine Direktkonjugate zur Verfügung stehen - indirekte Markierungsverfahren mit unkonjugierten, epitopspezifischen Primärantikörpern und konjugierten Sekundär- oder Tertiärantikörpern eingesetzt werden.

Immunmarkierungen von  $5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen erfolgten für 15 min bei 4°C in 100  $\mu\text{L}$  PEB-Puffer (PBS, 2 mM EDTA, 0,5% BSA). Zwischen aufeinander folgenden Inkubationen

wurden die Zellen in mindestens zehnfachem Volumen PEB gewaschen und bei 300 x g pelletiert. Durch Zugabe von 0,5 µg/mL Propidium-Iodid (PI) unmittelbar vor der Messung bei RT konnten tote Zellen - durch Interkalierung des Farbstoffes in die DNA-Doppelhelix – angefärbt und später von der Analyse ausgeschlossen werden.

Die durch Titration ermittelten Antikörper-Titer sind jeweils in der folgenden Tabelle angegeben:

**Tab. 19: Antikörper für MACS und FACS.**

Antikörper	Titer	Spezifität	Spezies	Konjugat	Hersteller
<i>full length A. v.</i> EGFP Polyclonal AB #8372-1	1:2000	EGFP	Kaninchen Serum	-	Clontech
R-PE-goat-anti-rabbit P-2771	1:200	Kaninchen IgG-H+L-Kette	Ziege IgG-Fraktion	Phycoerythrin (PE)	Molecular Probes
AffiniPure Goat-anti-rabbit IgG (H+L) 111-005-144	1:200	Kaninchen IgG-H+L-Kette	Ziege IgG-Fraktion	Allophycocyanin (APC)*	Dianova
anti-PE- <i>microbeads</i> #130-048-801	1:11	Phycoerythrin	Maus IgG1	<i>magnetic bead</i>	Miltenyi Biotec
Goat-anti-rabbit- <i>microbeads</i> #130-048-602	1:11	Kaninchen IgG H-Kette	Ziege Polyklonale F(ab') <sub>2</sub> -Fragmente	<i>magnetic bead</i>	Miltenyi Biotec

\* APC-Konjugation siehe (7.14.6)

### 7.20.1 Signalamplifikation mit dem APC-FASER-Kit

Mit dem APC-FASER (Fluorescence Amplification by Sequential Employment of Reagents) Kit (Miltenyi Biotec) lassen sich die Fluoreszenzintensitäten von APC-markierten Zellen verstärken. Dies gelingt durch sequentielle Addition zweier Reagenzien: dem APC-spezifischen Aktivator-Reagenz und dem APC-konjugierten Verstärker-Reagenz. Für weitere Verstärkung lassen sich die Reagenzien so oft wie gewünscht nacheinander anwenden.

Die Signalamplifikation APC-markierter HEPA 1-6-*pTRANS*-Zellen erfolgte nach Angaben des Herstellers durch zwei aufeinander folgende Amplifikationsrunden.

### 7.21 Magnetische Zellseparation (MACS)

Mit dieser Methode ist es möglich, bestimmte Zellen aus einem Zellgemisch zu isolieren (Abts et al. 1989, Miltenyi et al. 1990). Dazu werden die Zellen zunächst spezifisch über Antikörper (direkt oder indirekt) mit superparamagnetischen Mikropartikeln markiert. Die markierten Zellen werden dann von der Stahlkugelmatrix einer Trennsäule, die sich im Magnetfeld eines Permanentmagneten befindet, zurückgehalten. Nicht markierte Zellen passieren die Säule ungehindert. Durch gleichzeitige oder spätere fluoreszente Markierung der zu trennenden Zellen, kann die Separation mit Hilfe der Durchflusszytometrie kontrolliert

werden. Die Markierungen der Zielzellen erfolgte mit den in Tab. 19 spezifizierten Titern. MACS-Separationen erfolgten laut Angaben des Herstellers.

## 7.22 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die qualitative und quantitative Analyse von Einzelzellsuspensionen. Suspendierte Zellen werden dabei durch einen Laser-Strahl geführt. Die Zellen senden in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung - nach Laser-Anregung - charakteristische Lichtsignale aus, die von Photodetektoren registriert werden. Neben den physikalischen Eigenschaften (Zellgröße und Granularität) lassen sich durch Immunfärbungen mit Konjugaten aus Antikörpern mit Fluorophoren (bzw. chromophorhaltigen Proteinen) intra- und extrazelluläre Antigene nachweisen. Des Weiteren lassen sich Zellen hinsichtlich der Expression fluoreszenter Proteine (EGFP u. a.) charakterisieren.

In dieser Arbeit wurde die Expression von membranständigem, extrazellulärem EGFP in ES-Zellen und den daraus hergestellten hepatozytenartigen Zellen, HEPA 1-6-Zellen und primären Hepatozyten untersucht. Durch indirekte Immunfärbungen mit APC- und PE-gekoppelten Antikörpern konnten die Lokalisation des Proteins auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

Zur Analyse werden Zellsuspension im Durchflusszytometer unter hohem Druck durch ein Metallkapillare in eine Düse gepresst und tritt durch eine 70 µm große in den Strom der Hüllflüssigkeit (*sheath fluid*) ein, der sie in die Messküvette führt. Durch die Querschnittsverjüngung in der Messküvette werden sowohl der laminare Proben- als auch der Hüllstrom beschleunigt und verjüngt (hydrodynamische Fokussierung) und durch den fokussierten Laserstrahl geleitet (Abb. 41). Die Zellen passieren dabei den Laserstrahl eines Argon-Lasers (488nm) und eines nachgeschalteten Dioden-Lasers (633nm). Das durch die Zellen gebrochene und emmitierte Licht regt verschiedene Photodetektoren an:

Das Vorwärtstreulicht (FSC – *forward scatter*), das entlang der Achse des einfallenden Lichtes des Argon-Lasers gemessen wird, ist proportional zur Zelloberfläche (Zellgröße). Das Seitwärtsstreulicht (SSC – *sideward scatter*) wird in einem 90°-Winkel zur Achse des einfallenden Lichtes gemessen und ist proportional zur Zellkomplexität oder –granularität.

Die Detektion der Fluoreszenzsignale der Zellen erfolgt ebenfalls in einem 90°-Winkel zur Laser-Licht-Achse. Die emmitierten Lichtquanten passieren (wie auch das SSC) eine Sammellinse und werden über eine Reihe von Strahlteilern und Lang- und Kurzpassfiltern zu den verschiedenen Photodetektoreinheiten geleitet, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen detektieren können (Tab. 20).

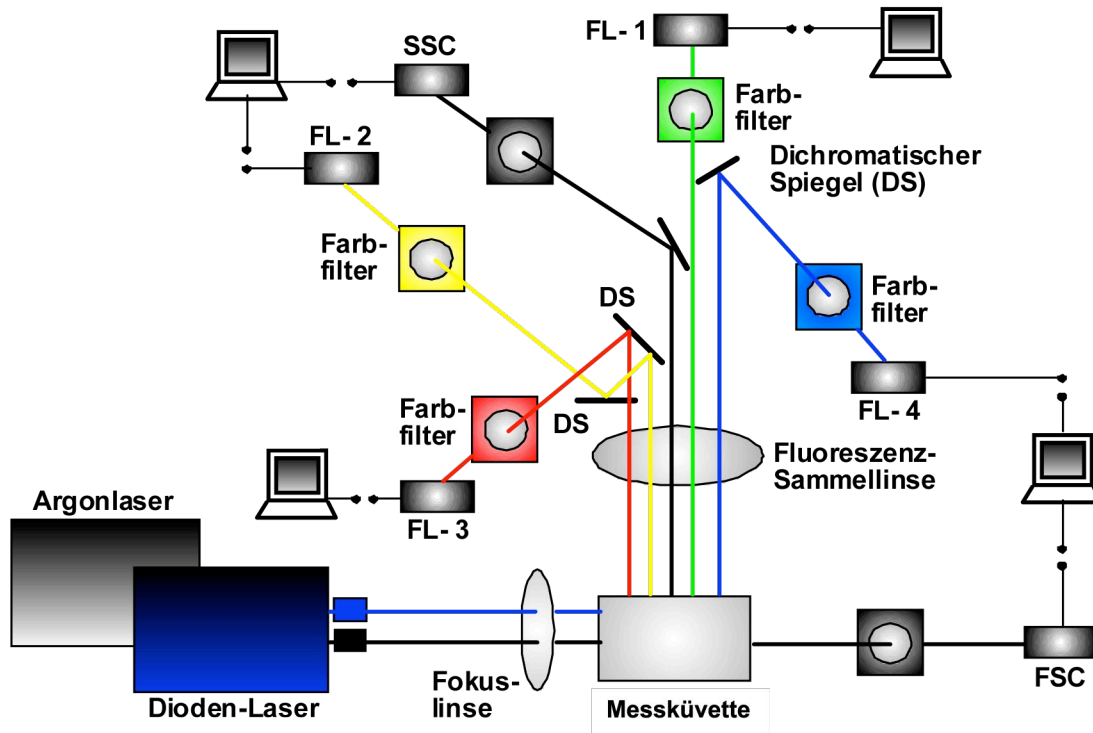


Abb. 41: Schematischer Aufbau der Detektionseinheit des Durchflusszytometers FACSCalibur™ (BD).

Tab. 20: Photodetektoren des FACSCalibur™ (BD)

Photodetektor	detektierte Wellenlänge (nm)	geeignete Fluorophore / fluoreszente Proteine
FSC	488/10	-
SSC	488/10	-
FL1	530/30	FITC, Alexa488, EGFP
FL2	585/42	PE
FL3	670LP	PI
FL4	661/16	APC, Cy5

Für die Charakterisierung der untersuchten Zellen standen die in Tab. 21 aufgeführten Fluorophore und fluoreszenten Proteine bzw. ihre Antikörper-Konjugate zur Verfügung.

Tab. 21: Verwendete Fluorophore und fluoreszente Proteine

Fluorophore / fluoreszente Proteine	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
EGFP	488	509
FITC	495	517
Phycoerythrin (PE)	565	576
Propidium-Iodid (PI)	538	617
Allophycocyanin (APC)	651	660

Die Aufnahme der Daten erfolgte mit dem FACSCalibur™-Durchflusszytometer (BD) und der Software CellQuest Version 3.1 oder Version 3.3. Die Erstellung von Histogrammen, bei denen ein Verteilung eines Messparameters dargestellt wird oder *dot plots*, bei denen jeweils zwei Messparameter einer Zelle gegeneinander aufgetragen werden, erfolgte mit der Software WinMidi 2.8.

Zellpopulationen wurden aufgrund ihrer physikalischen Parameter (FSC und SSC) identifiziert. Tote Zellen wurden durch eine PI-Färbung markiert und von der Analyse ausgeschlossen.

### 7.23 Mäusezucht und -haltung

Für die beschriebenen Experimente wurden Mäuse der in Tab. 22 aufgeführten Mausstämme verwendet. Die Mäuse wurden in einem künstlichen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten: Beleuchtung von 3:00 bis 15:00, Dunkelheit von 15:00 bis 3:00 Uhr.

### 7.24 Mausstämme

Tab. 22: verwendete Mausstämme

Bezeichnung	Einsatz	Fellfarbe	Referenz
CrI:CD1 (ICR)	Oozyteninjektion: Weibchen als Ammen nach Kreuzung mit mCrI:CD1 (ICR)	weiß	Charles River Laboratories
FVB / NCrI	Gewinnung von Spender-Oozyten (wFVB X mFVB)	weiß (Albino)	Charles River Laboratories
C57Bl/6 / 6NCrI	<i>β-actin-egfp</i> -Mäuse (Rückkreuzung in C57BL/6-Hintergrund)	schwarz	Hadjantonakis et al. (1998)
	<i>Itbp1</i> <sup>-/-</sup> - und WT Mäuse für HSC-Analysen	schwarz	Knöbel und Drews (in Revision)

### 7.25 Gewinnung, Manipulation und Reimplantation von Oozyten

Die DNA-Mikroinjektionen in den männlichen Vorkern von befruchteten Eizellen wurden, wie in der Literatur beschrieben, durchgeführt (Nagy 2003). Als Oozytenspender dienten superovulierte FVB / NCrI Weibchen (Tab. 22) die zwei Tage vor der Verpaarung mit FVB/NCrI Männchen mit 5 U Gonadotropin (Sigma-Aldrich) und nach 46-48 h mit 5U humanem Chorio-Gonadotropin (Sigma-Aldrich) stimuliert und direkt verpaart wurden. Am folgenden Tag wurden die Weibchen mit Vaginalpfropf als Oozytenspender ausgewählt. Die Eier wurden aus der Ampulle des Eileiters präpariert und 5 min bei RT mit Hyaluronidase (300 µg/mL, in M2-Medium, beides Sigma-Aldrich) behandelt, um die Cumulus-Zellen zu

entfernen. Bis zur Injektion wurden die Oozyten anschließend in M16-Medium (Sigma-Aldrich) im Brutschrank (Labotec Gasboy C40) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Die Injektion erfolgte in M2-Medium an einem Mikromanipulatorstand (Leitz TypM) mit einem Mikroinjektor (Eppendorf, Transjector Typ 5246). Die injizierten Eier oder die Zweizellstadien (nach ÜN-Kultivierung im Brutschrank) wurden unter dem Stereomikroskop 2000-C (Zeiss) in das Infundibulum einer scheinchwangeren Maus des Stammes Crl:CD1 (ICR) (0,5 Tage p.c.; verpaart mit einem vasktomierten Crl:CD1 (ICR) Männchen) reimplantiert (Tab. 22).



## 8 Anhang

**Anhang Tab. 1: Klassifizierung von hoch- und herunterregulierten Genen in aktivierten WT- und *ltbp1*<sup>-/-</sup>-HSC.** Verhältnisse <1 sind als negativ reziproke Werte angegeben. VarK: Variationskoeffizient der detektierten und berechneten Replikate des Gens pro Array. Für die Experimente HSC WT / *ltbp1*<sup>-/-</sup> sind die Einzelwerte aus drei technischen Replikaten der Arrays 85, 90 und 33 mit Standardabweichung ( $\delta$ ) angegeben. Für die Experimente aktivierte / ruhende HSC sind zwei technische Replikate angegeben. Die Klassifizierung eines Gens als Marker für aktivierte (AKT) oder ruhende (R) HSC erfolgte mit dem dem Referenzdatenatz: aktivierte/ruhende HSC (Schwellenwert (+) / (-)-1,5-fach.

Gene-Symbol	GenBank-Acc.No.	Gen-Name	Verhältnis aktivierte HSC:		Verhältnis aktivierte HSC:		Verhältnis aktivierte HSC:		Verhältnis aktivierte HSC:		Verhältnis aktivierte HSC:		Marker für aktivierte / ruhende HSC
			VarK 85	HSC WT / <i>ltbp1</i> <sup>-/-</sup> Array 85	VarK 90	HSC WT / <i>ltbp1</i> <sup>-/-</sup> Array 90	VarK 33	HSC WT / <i>ltbp1</i> <sup>-/-</sup> Array 33	VarK 40	HSC WT / <i>ltbp1</i> <sup>-/-</sup> Array 40	VarK 42	HSC WT / <i>ltbp1</i> <sup>-/-</sup> Array 42	
<i>ltbp1</i>	NM_019919	latent transforming growth factor beta binding protein 1	2,38	2,22	9%	3,57	12%	1,79	4%	1,99	10%	1,89	KO/AKT
<i>ptgs2</i>	NM_011188	prostaglandin-endothelinoxide synthase 2	1,92	1,92	2%	2,13	3%	15,72	11%	14,12	9%	14,92	AKT
<i>tm4sf1</i>	NM_008536	transmembrane 4 superfamily member 1	1,89	1,82	3%	1,89	1%	20,73	12%	19,29	3%	20,01	AKT
<i>mmp13</i>	NM_008607	matrix metalloproteinase 13	1,72	1,89	4%	1,89	1%	40,28	9%	38,36	25%	39,32	AKT
<i>f3</i>	NM_010171	coagulation factor III	1,54	2,04	19%	1,92	6%	1,69	13%	1,47	14%	1,68	AKT
<i>mmp10</i>	NM_019471	matrix metalloproteinase 10	1,85	1,67	4%	1,79	3%	23,28	28%	15,59	39%	19,44	AKT
<i>thbd</i>	NM_009378	thrombomodulin	1,82	1,67	3%	1,75	2%	25,04	27%	15,37	35%	20,21	AKT
<i>plaur</i>	NM_011113	plasminogen activator, urokinase receptor	1,61	1,54	9%	1,69	5%	1,68	6%	1,27	12%	1,48	-
<i>thbs3</i>	NM_013691	thrombospondin 3	1,54	1,64	9%	1,56	2%	3,05	24%	3,61	11%	3,33	AKT
<i>mapk6</i>	NM_015806	mitogen-activated protein kinase 6	1,49	1,49	3%	1,67	5%	4,85	10%	4,12	4%	4,49	AKT
<i>pgf</i>	NM_008827	placental growth factor	1,47	1,52	6%	1,61	2%	4,47	39%	8,16	5%	6,32	AKT
<i>ccnd1</i>	NM_007631	cyclin D1	1,59	1,41	4%	1,54	3%	4,28	2%	3,90	7%	4,09	AKT
<i>col18a1</i>	NM_009929	procollagen, type XVIII, alpha 1	-1,52	-1,22	8%	-1,78	15%	-1,56	31%	-1,32	25%	-1,43	-
<i>rgs3</i>	NM_019492	regulator of G-protein signaling 3	-1,54	-1,46	5%	-1,54	2%	-1,72	19%	-1,61	4%	-1,67	R
<i>col6a2</i>	NM_146007	procollagen, type VI, alpha 2	-1,49	-1,45	2%	-1,62	11%	-1,96	7%	-1,89	15%	-1,92	R
<i>rgs4</i>	NM_009062	regulator of G-protein signaling 4	-1,69	-1,35	1%	-1,54	1%	-2,33	3%	-2,00	2%	-2,15	R
<i>thbs2</i>	NM_011581	thrombospondin 2	-1,57	-1,52	3%	-1,50	3%	1,31	11%	1,57	2%	1,44	-
<i>cfs</i>	NM_144938	complement component 1, s subcomponent	-1,45	-1,28	4%	-1,87	6%	-9,09	13%	-8,33	5%	-8,70	R
<i>socs3</i>	NM_077007	suppressor of cytokine signaling 3	-1,69	-1,48	25%	-1,65	2%	-4,00	14%	-4,17	7%	-4,08	R
<i>mcam</i>	NM_023061	melanoma cell adhesion molecule	-1,60	-1,46	3%	-1,57	2%	-1,41	25%	-2,22	14%	-1,72	R
<i>hix1</i>	NM_008250	H2.O-like homeo box 1 (Drosophila)	-1,69	-1,35	1%	-1,61	4%	-2,86	20%	-2,38	21%	-2,60	R
<i>adamts2</i>	NM_175643	H2.O-like homeo box 1 (Drosophila) with thrombospondin type 1 motif, 2	-1,62	-1,58	6%	-1,70	4%	-1,96	1%	-2,08	2%	-2,02	R
<i>mgst1</i>	NM_019946	microsomal glutathione S-transferase 1	-1,71	-1,57	2%	-1,63	1%	4,21	21%	4,83	12%	4,52	AKT
<i>col1a2</i>	NM_007743	procollagen, type I, alpha 2	-1,72	-1,58	3%	-1,64	2%	-1,52	2%	-1,35	1%	-1,43	-
<i>p2ry14</i>	NM_133200	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14	-1,71	-1,63	4%	-1,63	2%	4,98	2%	4,89	7%	4,94	AKT
<i>ifit1</i>	NM_008331	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	-1,85	-1,38	2%	-1,91	5%	-4,35	6%	-3,45	17%	-3,85	R
<i>gata4</i>	NM_008092	GATA binding protein 4	-1,99	-1,51	3%	-1,76	3%	-1,52	16%	-1,35	8%	-1,43	R
<i>itgb5</i>	NM_010580	integrin beta 5	-1,72	-1,79	1%	-1,84	2%	1,04	2%	-1,09	2%	-1,02	-
<i>bgn</i>	NM_007542	biglycan	-1,80	-1,82	5%	-1,80	2%	-1,85	4%	-2,00	2%	-1,92	R
<i>prelp</i>	NM_054077	proline arginine-rich end leucine-rich repeat	-1,56	-2,05	12%	-2,14	4%	-1,72	5%	-2,08	2%	-1,89	R
<i>hgf</i>	NM_010427	hepatocyte growth factor	-2,04	-1,82	2%	-1,91	3%	-1,92	5%	-4,35	4%	-4,35	R
<i>mfpap2</i>	NM_008546	microfibrillar-associated protein 2	-1,98	-1,54	5%	-2,34	3%	-1,04	8%	-1,22	12%	-1,12	-
<i>ifist</i>	NM_010560	interleukin 6 signal transducer	-2,12	-1,75	2%	-2,00	2%	-3,33	3%	-3,23	7%	-3,28	R
<i>nos3</i>	NM_008713	nitric oxide synthase 3, endothelial cell	-2,08	-1,51	5%	-2,30	7%	-2,63	10%	-2,56	15%	-2,60	R
<i>egr1</i>	NM_007913	early growth response 1	-1,91	-1,51	4%	-2,52	3%	-10,00	6%	-7,69	15%	-8,70	R
<i>col6a1</i>	NM_009933	procollagen, type VI, alpha 1	-2,22	-1,98	2%	-2,15	2%	-4,76	7%	-4,55	4%	-4,65	R
<i>clu</i>	NM_013492	clusterin	-2,23	-2,16	4%	-2,07	2%	-1,92	2%	-1,64	1%	-1,77	R
<i>cmkorr1</i>	NM_007722	chemokine orphan receptor 1	-1,91	-1,69	2%	-3,49	3%	-1,03	8%	-1,28	10%	-1,14	-
<i>lum</i>	NM_008524	lumican	-2,26	-2,38	17%	-2,62	4%	-10,00	6%	-10,00	3%	-10,00	R
<i>lrat</i>	NM_023624	lecithin-retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol-O-acyltransferase)	-3,69	-2,88	2%	-3,60	3%	-20,00	5%	-14,29	6%	-16,67	R



## 9 Literaturverzeichnis

- Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abe SI, Yamamura KI** (1996) Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res* 229: 27-34.
- Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H** (1989) CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J Immunol Methods* 125: 19-28.
- Albanis E, Friedman SL** (2001) Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy. *Clin Liver Dis* 5: 315-334.
- Arias M, Lahme B, Van de Leur E, Gressner AM, Weiskirchen R** (2002) Adenoviral delivery of an antisense RNA complementary to the 3' coding sequence of transforming growth factor-beta1 inhibits fibrogenic activities of hepatic stellate cells. *Cell Growth Differ* 13: 265-273.
- Arias M, Sauer-Lehnen S, Treptau J, Janoschek N, Theuerkauf I, Buettner R, Gressner AM, Weiskirchen R** (2003) Adenoviral expression of a transforming growth factor-beta1 antisense mRNA is effective in preventing liver fibrosis in bile-duct ligated rats. *BMC Gastroenterol* 3: 29.
- Armendariz-Borunda J, Katayama K, Seyer JM** (1992) Transcriptional mechanisms of type I collagen gene expression are differentially regulated by interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and transforming growth factor beta in Ito cells. *J Biol Chem* 267: 14316-14321.
- Arthur MJ** (2000) Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G245-G249.
- Asahina K, Fujimori H, Shimizu-Saito K, Kumashiro Y, Okamura K, Tanaka Y, Teramoto K, Arii S, 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.
- Bachem MG, Sell KM, Melchior R, Kropf J, Eller T, Gressner AM** (1993) Tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) stimulate fibronectin synthesis and the transdifferentiation of fat-storing cells in the rat liver into myofibroblasts. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 63: 123-130.
- Bassermann** (1994) *Der große Atlas der Anatomie*, Niedernhausen/Ts.
- Bataller R, Brenner DA** (2005) Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-218.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G** (2001) Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. *Science* 291: 447-450.
- Benner KU** (1996) *Der Körper des Menschen*. Weltbild Verlag GmbH, Augsburg.
- Benyon RC, Arthur MJ** (2001) Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21: 373-384.
- Benyon RC, Iredale JP** (2000) Is liver fibrosis reversible? *Gut* 46: 443-446.
- Besaratinia A, Pfeifer GP** (2005) Investigating DNA adduct-targeted mutagenicity of tamoxifen: preferential formation of tamoxifen-DNA adducts in the human p53 gene in SV40 immortalized hepatocytes but not endometrial carcinoma cells. *Biochemistry* 44: 8418-8427.
- Bhunchet E, Wake K** (1992) Role of mesenchymal cell populations in porcine serum-induced rat liver fibrosis. *Hepatology* 16: 1452-1473.
- Bioulac-Sage P, Blanc JF, Lepreux S, Balabaud C, Rosenbaum J, Desmoulière A** (2000) [Cirrhosis: forever?]. *Gastroenterol Clin Biol* 24: 877-882.
- Birnboim HC, Doly J** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.

- Blomhoff R, Wake K** (1991) Perisinusoidal stellate cells of the liver: important roles in retinol metabolism and fibrosis. *Faseb J* 5: 271-277.
- Blouin A, Bolender RP, Weibel ER** (1977) Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol* 72: 441-455.
- Borkham-Kamphorst E, Herrmann J, Stoll D, Treptau J, Gressner AM, Weiskirchen R** (2004) Dominant-negative soluble PDGF-beta receptor inhibits hepatic stellate cell activation and attenuates liver fibrosis. *Lab Invest* 84: 766-777.
- Borkham-Kamphorst E, Stoll D, Gressner AM, Weiskirchen R** (2004) Inhibitory effect of soluble PDGF-beta receptor in culture-activated hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 451-462.
- Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E** (1986) Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* 6: 718-722.
- Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A, Felsenfeld G** (2002) The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 Suppl 4: 16433-16437.
- Capecchi MR** (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288-1292.
- Carothers AM, Urlaub G, Mucha J, Grunberger D, Chasin LA** (1989) Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA, and Taq sequencing by a novel method. *Biotechniques* 7: 494-496, 498-499.
- Cascio S, Zaret KS** (1991) Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation. *Development* 113: 217-225.
- Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A, Foschi M, Caligiuri A, Pinzani M, Surrenti C** (1997) Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 25: 361-367.
- Cassiman D, Roskams T** (2002) Beauty is in the eye of the beholder: emerging concepts and pitfalls in hepatic stellate cell research. *J Hepatol* 37: 527-535.
- Chen Y, Ali T, Todorovic V, O'leary JM, Kristina Downing A, Rifkin DB** (2005) Amino acid requirements for formation of the TGF-beta-latent TGF-beta binding protein complexes. *J Mol Biol* 345: 175-186.
- Chen Y, Dabovic B, Colarossi C, Santori FR, Lilic M, Vukmanovic S, Rifkin DB** (2003) Growth retardation as well as spleen and thymus involution in latent TGF-beta binding protein (Ltbp)-3 null mice. *J Cell Physiol* 196: 319-325.
- Chen ZY, He CY, Meuse L, Kay MA** (2004) Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther* 11: 856-864.
- Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arai S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H** (2002) Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 36: 22-29.
- Choi D, Oh HJ, Chang UJ, Koo SK, Jiang JX, Hwang SY, Lee JD, Yeoh GC, Shin HS, Lee JS, Oh B** (2002) In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant* 11: 359-368.
- Chung, J. H., Whiteley, M. and Felsenfeld, G.** (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell*, 74, 505-14.
- Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G** (1997) Characterization of the chicken beta-globin insulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 575-580.
- Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS** (2002) Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 20: 139-145.

- Cole J, Quach du L, Sundaram K, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE** (2002) Mice lacking endothelial angiotensin-converting enzyme have a normal blood pressure. *Circ Res* 90: 87-92.
- Couvelard A, Scoazec JY, Dauge MC, Bringuier AF, Potet F, Feldmann G** (1996) Structural and functional differentiation of sinusoidal endothelial cells during liver organogenesis in humans. *Blood* 87: 4568-4580.
- Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Obata H, Zambuto L, Perle MA, Rifkin DB** (2002) Bone abnormalities in latent TGF- $\beta$  binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF- $\beta$  bioavailability. *J Cell Biol* 156: 227-232.
- Dabovic B, Chen Y, Colarossi C, Zambuto L, Obata H, Rifkin DB** (2002) Bone defects in latent TGF- $\beta$  binding protein (Ltbp)-3 null mice; a role for Ltbp in TGF- $\beta$  presentation. *J Endocrinol* 175: 129-141.
- Dallas SL, Park-Snyder S, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF** (1994) Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF  $\beta$ ) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of a latent complex lacking the latent TGF  $\beta$ -binding protein. *J Biol Chem* 269: 6815-6821.
- Darlington GJ, Papaconstantinou J, Sammons DW, Brown PC, Wong EY, Esterman AL, Kang J** (1982) Generation and characterization of variants of mouse hepatoma cells with defects in hepato-specific gene expression. I. Albumin synthesis variants. *Somatic Cell Genet* 8: 451-464.
- Darlington GJ, Tsai CC, Samuelson LC, Gumucio DL, Meisler MH** (1986) Simultaneous expression of salivary and pancreatic amylase genes in cultured mouse hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 6: 969-975.
- de Leeuw AM, McCarthy SP, Geerts A, Knook DL** (1984) Purified rat liver fat-storing cells in culture divide and contain collagen. *Hepatology* 4: 392-403.
- Deutsch G, Jung J, Zheng M, Lora J, Zaret KS** (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128: 871-881.
- Duncan SA** (2000) Transcriptional regulation of liver development. *Dev Dyn* 219: 131-142.
- Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M** (1998) Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281: 692-695.
- Eberwine J** (1996) Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques* 20: 584-591.
- Ellison AR, West JD, Spears N, Murray A, Everett CA, Bishop JO** (2000) Failure of founder transgenic male mice to transmit an attenuated HSV thymidine kinase transgene results from mosaicism and sperm competition. *Mol Reprod Dev* 55: 249-255.
- Enseñat-Waser R, Santana A, Vicente-Salar N, Cigudosa JC, Roche E, Soria B, Reig JA** (2006) Isolation and characterization of residual undifferentiated mouse embryonic stem cells from embryoid body cultures by fluorescence tracking. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42: 115-123.
- Enzan H, Hara H, Yamashita Y, Ohkita T, Yamane T** (1983) Fine structure of hepatic sinusoids and their development in human embryos and fetuses. *Acta Pathol Jpn* 33: 447-466.
- Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S** (1997) Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc Res Tech* 39: 336-349.
- Fair JH, Cairns BA, Lapaglia M, Wang J, Meyer AA, Kim H, Hatada S, Smithies O, Pevny L** (2003) Induction of hepatic differentiation in embryonic stem cells by co-culture with embryonic cardiac mesoderm. *Surgery* 134: 189-196.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13.
- Feinberg AP, Vogelstein B** (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* 137: 266-267.

- Felsenfeld G, Boyes J, Chung J, Clark D, Studitsky V** (1996) Chromatin structure and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9384-9388.
- Forbes SJ, Poulson R, Wright NA** (2002) Hepatic and renal differentiation from blood-borne stem cells. *Gene Ther* 9: 625-630.
- Forsyth S, Horvath A, Coughlin P** (2003) A review and comparison of the murine alpha1-antitrypsin and alpha1-antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins. *Genomics* 81: 336-345.
- Fox ES, Thomas P, Broitman SA** (1988) Uptake and modification of 125I-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Hepatology* 8: 1550-1554.
- Fox ES, Thomas P, Broitman SA** (1989) Clearance of gut-derived endotoxins by the liver. Release and modification of 3H, 14C-lipopolysaccharide by isolated rat Kupffer cells. *Gastroenterology* 96: 456-461.
- Friedman SL** (1993) Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 328: 1828-1835.
- Friedman SL** (1999) The virtuosity of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 117: 1244-1246.
- Friedman SL, Wei S, Blaner WS** (1993) Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol* 264: G947-G952.
- Garcia-Trevijano ER, Iraburu MJ, Fontana L, Dominguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A, Rojkind M** (1999) Transforming growth factor beta1 induces the expression of alpha1(I) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide-C/EBPbeta-dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 29: 960-970.
- Gardner CR, Wasserman AJ, Laskin DL** (1991) Liver macrophage-mediated cytotoxicity toward mastocytoma cells involves phagocytosis of tumor targets. *Hepatology* 14: 318-324.
- Gay E, Seurin D, Babajko S, Doublier S, Cazillis M, Binoux M** (1997) Liver-specific expression of human insulin-like growth factor binding protein-1 in transgenic mice: repercussions on reproduction, ante- and perinatal mortality and postnatal growth. *Endocrinology* 138: 2937-2947.
- Geerts A** (2001) History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21: 311-335.
- Geerts A, Niki T, Hellemans K, De Craemer D, Van Den Berg K, Lazou JM, Stange G, Van De Winkel M, De Bleser P** (1998) Purification of rat hepatic stellate cells by side scatter-activated cell sorting. *Hepatology* 27: 590-598.
- Giltay R, Kostka G, Timpl R** (1997) Sequence and expression of a novel member (LTBP-4) of the family of latent transforming growth factor-beta binding proteins. *FEBS Lett* 411: 164-168.
- Gong W, Roth S, Michel K, Gressner AM** (1998) Isoforms and splice variant of transforming growth factor beta-binding protein in rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 114: 352-363.
- Gómez-Lechón MJ, Ponsoda X, Bort R, Castell JV** (2001) The use of cultured hepatocytes to investigate the metabolism of drugs and mechanisms of drug hepatotoxicity. *Altern Lab Anim* 29: 225-231.
- Greenwel P, Iraburu MJ, Reyes-Romero M, Meraz-Cruz N, Casado E, Solis-Herruzo JA, Rojkind M** (1995) Induction of an acute phase response in rats stimulates the expression of alpha 1(I) procollagen messenger ribonucleic acid in their livers. Possible role of interleukin-6. *Lab Invest* 72: 83-91.
- Gressner AM** (1994) Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis. *Gut* 35: 1331-1333.
- Gressner AM** (1998) The cell biology of liver fibrogenesis - an imbalance of proliferation, growth arrest and apoptosis of myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 292: 447-452.
- Gressner AM, Bachem MG** (1990) Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin Liver Dis* 10: 30-46.

- Gressner AM, Bachem MG** (1995) Molecular mechanisms of liver fibrogenesis--a homage to the role of activated fat-storing cells. *Digestion* 56: 335-346.
- Gressner AM, Dooley S, Weiskirchen R** (2005) *Handbook of Fibrosis*, Dufour, Clavien, Trautwein, Graf (ed). Springer Verlag, Heidelberg. 139-50.
- Gressner AM, Krull N, Bachem MG** (1994) Regulation of proteoglycan expression in fibrotic liver and cultured fat-storing cells. *Pathol Res Pract* 190: 864-882.
- Gressner AM, Weiskirchen R** (2006) Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 10: 76-99.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S** (2002) Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7: d793-d807.
- Gualdi R, Bossard P, Zheng M, Hamada Y, Coleman JR, Zaret KS** (1996) Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev* 10: 1670-1682.
- Guo ZS, Wang LH, Eisensmith RC, Woo SL** (1996) Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther* 3: 802-810.
- Guyot C, Lepreux S, Combe C, Doudnikoff E, Bioulac-Sage P, Balabaud C, Desmouliere A** (2006) Hepatic fibrosis and cirrhosis: the (myo)fibroblastic cell subpopulations involved. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 135-151.
- Hadjantonakis AK, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A** (1998) Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev* 76: 79-90.
- Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N** (2001) Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 497: 15-19.
- Hamazaki T, Terada N** (2003) In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Methods Enzymol* 365: 277-287.
- Hasegawa K, Nakatsuji N** (2002) Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS Lett* 520: 47-52.
- Hayhurst GP, Lee YH, Lambert G, Ward JM, Gonzalez FJ** (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.
- Hellemans K, Rombouts K, Quartier E, Dittie AS, Knorr A, Michalik L, Rogiers V, Schuit F, Wahli W, Geerts A** (2003) PPARbeta regulates vitamin A metabolism-related gene expression in hepatic stellate cells undergoing activation. *J Lipid Res* 44: 280-295.
- Hellen CU, Sarnow P** (2001) Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev* 15: 1593-1612.
- Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA** (1999) The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 30: 77-87.
- Herbst H, Wege T, Milani S, Pellegrini G, Orzechowski HD, Bechstein WO, Neuhaus P, Gressner AM, Schuppan D** (1997) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 RNA expression in rat and human liver fibrosis. *Am J Pathol* 150: 1647-1659.
- Hu A, Cai J, Zheng Q, He X, Pan Y, Li L** (2003) Hepatic differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Chin Med J (Engl)* 116: 1893-1897.
- Hu AB, Cai JY, Zheng QC, He XQ, Shan Y, Pan YL, Zeng GC, Hong A, Dai Y, Li LS** (2004) High-ratio differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes in vitro. *Liver Int* 24: 237-245.
- Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J** (2004) Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41: 233-264.
- Imai S, Okuno M, Moriwaki H, Muto Y, Murakami K, Shudo K, Suzuki Y, Kojima S** (1997) 9,13-dicis-Retinoic acid induces the production of tPA and activation of latent TGF-beta via RAR alpha in a human liver stellate cell line, LI90. *FEBS Lett* 411: 102-106.

- Innis MA, Gelfand DH** (1990) Optimization of PCRs. In *PCR protocols: A guide to methods and applications* pp 3-12. Innis MA, Academic Press.
- Iredale JP, Goddard S, Murphy G, Benyon RC, Arthur MJ** (1995) Tissue inhibitor of metalloproteinase-I and interstitial collagenase expression in autoimmune chronic active hepatitis and activated human hepatic lipocytes. *Clin Sci (Lond)* 89: 75-81.
- Ishizaka S, Shiroy A, Kanda S, Yoshikawa M, Tsujinoue H, Kuriyama S, Hasuma T, Nakatani K, Takahashi K** (2002) Development of hepatocytes from ES cells after transfection with the HNF-3beta gene. *FASEB J* 16: 1444-1446.
- Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty N** (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6: 88-95.
- Jäger R, Maurer J, Jacob A, Schorle H** (2004) Cell type-specific conditional regulation of the c-myc proto-oncogene by combining Cre/loxP recombination and tamoxifen-mediated activation. *Genesis* 38: 145-150.
- Jiang JY, Li AD, Yang SX, Hong HR, Song HR, Mei Y, Zhou HY, Yang HJ** (2005) [Expression of HNF4alpha and HNF6 mRNA during the process of mouse liver development]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 36: 493-496.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM** (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30: 896-904.
- Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM, Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arai S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H, Yin Y, Lim YK, Salto-Tellez M, Ng SC, Lin CS, Lim SK** (2002) Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Exp Cell Res* 272: 15-22.
- Joyner AL** (2000) *Gene targeting: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS** (1999) Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284: 1998-2003.
- Jungermann K** (1995) Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 103: 81-91.
- Junquiera LC, Junqueira LC, Brentani RR** (1979) A simple and sensitive method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem* 94: 96-99.
- Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T, Morikawa Y, Senba E, Nakashima K, Taga T, Yoshida K, Kishimoto T, Miyajima A** (1999) Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *Embo J* 18: 2127-2136.
- Kanda S, Shiroy A, Ouji Y, Birumachi J, Ueda S, Fukui H, Tatsumi K, Ishizaka S, Takahashi Y, 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.
- Kawashima R, Mochida S, Matsui A, YouLuTuZ Y, Ishikawa K, Toshima K, Yamanobe F, Inao M, Ikeda H, Ohno A, Nagoshi S, Uede T, Fujiwara K** (1999) Expression of osteopontin in Kupffer cells and hepatic macrophages and Stellate cells in rat liver after carbon tetrachloride intoxication: a possible factor for macrophage migration into hepatic necrotic areas. *Biochem Biophys Res Commun* 256: 527-531.
- Kekki M, Siltanen P** (1960) Microdetermination of protein by determining the protein by determining the protein bound copper of the biuret complex with oxalyldihydrazide. *Scand J Clin Lab Invest* 12: 235-238.
- Kiernan** (1833) The anatomy and physiology of the liver. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* : 711-770.



- Kinnman N, Francoz C, Barbu V, Wendum D, Rey C, Hultcrantz R, Poupon R, Housset C** (2003) The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 83: 163-173.
- Kinnman N, Housset C** (2002) Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis. *Front Biosci* 7: d496-d503.
- Kinoshita T, Miyajima A** (2002) Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 1592: 303-312.
- Kmieć Z** (2001) Cooperation of liver cells in health and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 161: III-XIII, 1-151.
- Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C, Ramadori G** (1999) Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol* 30: 48-60.
- Knittel T, Müller L, Saile B, Ramadori G** (1997) Effect of tumour necrosis factor-alpha on proliferation, activation and protein synthesis of rat hepatic stellate cells. *J Hepatol* 27: 1067-1080.
- Knolle PA, Schmitt E, Jin S, Germann T, Duchmann R, Hegenbarth S, Gerken G, Lohse AW** (1999) Induction of cytokine production in naive CD4(+) T cells by antigen-presenting murine liver sinusoidal endothelial cells but failure to induce differentiation toward Th1 cells. *Gastroenterology* 116: 1428-1440.
- Knook DL, Seffelaar AM, de Leeuw AM** (1982) Fat-storing cells of the rat liver. Their isolation and purification. *Exp Cell Res* 139: 468-471.
- Koli K, Wempe F, Sterner-Kock A, Kantola A, Komor M, Hofmann WK, von Melchner H, Keski-Oja J** (2004) Disruption of LTBP-4 function reduces TGF-beta activation and enhances BMP-4 signaling in the lung. *J Cell Biol* 167: 123-133.
- Kristensen DB, Kawada N, Imamura K, Miyamoto Y, Tateno C, Seki S, Kuroki T, Yoshizato K** (2000) Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32: 268-277.
- Kuai XL, Cong XQ, Li XL, Xiao SD** (2003) Generation of hepatocytes from cultured mouse embryonic stem cells. *Liver Transpl* 9: 1094-1099.
- Kubo A, Shinozaki K, Shannon JM, Kouskoff V, Kennedy M, Woo S, Fehling HJ, Keller G** (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development* 131: 1651-1662.
- Kumashiro Y, Asahina K, Ozeki R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Kida Y, Inoue K, Kaneko M, Sato T, Teramoto K, Aii S, Teraoka H** (2005) Enrichment of hepatocytes differentiated from mouse embryonic stem cells as a transplantable source. *Transplantation* 79: 550-557.
- Kumashiro Y, Teramoto K, Shimizu-Saito K, Asahina K, Teraoka H, Aii S** (2005) Isolation of hepatocyte-like cells from mouse embryoid body cells. *Transplant Proc* 37: 299-300.
- Kupffer** (1876) Über Sternzellen der Leber. Briefliche Mitteilung an Professor Waldeyer. *Arch Mikr Anat* : 253-358.
- Lack J, O'Leary JM, Knott V, Yuan X, Rifkin DB, Handford PA, Downing AK** (2003) Solution structure of the third TB domain from LTBP1 provides insight into assembly of the large latent complex that sequesters latent TGF-beta. *J Mol Biol* 334: 281-291.
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lavon N, Benvenisty N** (2005) Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 96: 1193-1202.
- Lee HS, Miao LH, Chen CH, Chiou LL, Huang GT, Yang PM, Sheu JC** (2003) Differential role of p38 in IL-1alpha induction of MMP-9 and MMP-13 in an established liver myofibroblast cell line. *J Biomed Sci* 10: 757-765.

- Levinson-Dushnik M, Benvenisty N** (1997) Involvement of hepatocyte nuclear factor 3 in endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 17: 3817-3822.
- Linhart HG, Ishimura-Oka K, DeMayo F, Kibe T, Repka D, Poindexter B, Bick RJ, Darlington GJ** (2001) C/EBPalpha is required for differentiation of white, but not brown, adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 12532-12537.
- Liu XJ, Yang L, Luo FM, Wu HB, Qiang Q** (2004) Association of differentially expressed genes with activation of mouse hepatic stellate cells by high-density cDNA microarray. *World J Gastroenterol* 10: 1600-1607.
- Löffler G, Petrides PE** (2006) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, Berlin.
- Lyons RM, Keski-Oja J, Moses HL** (1988) Proteolytic activation of latent transforming growth factor-beta from fibroblast-conditioned medium. *J Cell Biol* 106: 1659-1665.
- MacPhee PJ, Schmidt EE, Groom AC** (1995) Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol* 269: G692-G698.
- Magin TM, McWhir J, Melton DW** (1992) A new mouse embryonic stem cell line with good germ line contribution and gene targeting frequency. *Nucleic Acids Res* 20: 3795-3796.
- Martin DI, Whitelaw E** (1996) The vagaries of variegating transgenes. *Bioessays* 18: 919-923.
- Martin GR, Evans MJ** (1975) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1441-1445.
- Martinez-Salas E, Ramos R, Lafuente E, Lopez de Quinto S** (2001) Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J Gen Virol* 82: 973-984.
- Massagué J** (2000) How cells read TGF-beta signals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 169-178.
- Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret KS** (2001) Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 294: 559-563.
- Matsumoto T, Kawakami M** (1982) The unit-concept of hepatic parenchyma--a re-examination based on angioarchitectural studies. *Acta Pathol Jpn* 32 Suppl 2: 285-314.
- Matsusue K, Haluzik M, Lambert G, Yim SH, Gavrilova O, Ward JM, Brewer B, J, Reitman ML, Gonzalez FJ** (2003) Liver-specific disruption of PPARgamma in leptin-deficient mice improves fatty liver but aggravates diabetic phenotypes. *J Clin Invest* 111: 737-747.
- Matsuura T, Hasumura S, Nagamori S, Murakami K** (1999) Retinol esterification activity contributes to retinol transport in stellate cells. *Cell Struct Funct* 24: 111-116.
- Mazzocca A, Carloni V, Sciammetta S, Cordella C, Pantaleo P, Caldini A, Gentilini P, Pinzani M** (2002) Expression of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and their role in hepatic stellate cell motility and wound healing migration. *J Hepatol* 37: 322-330.
- Michalopoulos GK, Bowen WC, Mulè K, Luo J** (2003) HGF-, EGF-, and dexamethasone-induced gene expression patterns during formation of tissue in hepatic organoid cultures. *Gene Expr* 11: 55-75.
- Michel K, Roth S, Trautwein C, Gong W, Flemming P, Gressner AM** (1998) Analysis of the expression pattern of the latent transforming growth factor beta binding protein isoforms in normal and diseased human liver reveals a new splice variant missing the proteinase-sensitive hinge region. *Hepatology* 27: 1592-1599.
- Milani S, Herbst H, Schuppan D, Grappone C, Pellegrini G, Pinzani M, Casini A, Calabro A, Ciancio G, Stefanini F, et al.** (1994) Differential expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 genes in normal and fibrotic human liver. *Am J Pathol* 144: 528-537.
- Milot E, Strouboulis J, Trimborn T, Wijgerde M, de Boer E, Langeveld A, Tan-Un K, Vergeer W, Yannoutsos N, Grosveld F, Fraser P** (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87: 105-114.
- Miltenyi S, Müller W, Weichel W, Radbruch A** (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11: 231-238.

- Miyashita H, Suzuki A, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H** (2002) Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro. *Cell Transplant* 11: 429-434.
- Miyazono K, Olofsson A, Colosetti P, Heldin CH** (1991) A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J* 10: 1091-1101.
- Miyazono K, Thyberg J, Heldin CH** (1992) Retention of the transforming growth factor-beta 1 precursor in the Golgi complex in a latent endoglycosidase H-sensitive form. *J Biol Chem* 267: 5668-5675.
- Morén A, Olofsson A, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH** (1994) Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J Biol Chem* 269: 32469-32478.
- Moses HL** (1992) TGF-beta regulation of epithelial cell proliferation. *Mol Reprod Dev* 32: 179-184.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Munger JS, Harpel JG, Gleizes PE, Mazzieri R, Nunes I, Rifkin DB** (1997) Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int* 51: 1376-1382.
- Murray V** (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 8889.
- Nagy A** (2003) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC** (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8424-8428.
- Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T** (2004) Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37: 16-28.
- Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y** (2004) Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. *Med Electron Microsc* 37: 29-36.
- Nierhoff D, Ogawa A, Oertel M, Chen YQ, Shafritz DA** (2005) Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. *Hepatology* 42: 130-139.
- Noguera I, Obata H, Gualandris A, Cowin P, Rifkin DB** (2003) Molecular cloning of the mouse Ltbp-1 gene reveals tissue specific expression of alternatively spliced forms. *Gene* 308: 31-41.
- Nowak G, Ericzon BG, Nava S, Jaksch M, Westgren M, Sumitran-Holgersson S** (2005) Identification of expandable human hepatic progenitors which differentiate into mature hepatic cells in vivo. *Gut* 54: 972-979.
- O'Byrne SM, Wongsiriroj N, Libien J, Vogel S, Goldberg IJ, Baehr W, Palczewski K, Blaner WS** (2005) Retinoid absorption and storage is impaired in mice lacking lecithin:retinol acyltransferase (LRAT). *J Biol Chem* 280: 35647-35657.
- Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA** (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19: 193-204.
- Oklü R, Hesketh R** (2000) The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J* 352 Pt 3: 601-610.
- Oklü R, Hesketh TR, Metcalfe JC, Kemp PR** (1998) Expression of alternatively spliced human latent transforming growth factor beta binding protein-1. *FEBS Lett* 435: 143-148.
- Oklü R, Metcalfe JC, Hesketh TR, Kemp PR** (1998) Loss of a consensus heparin binding site by alternative splicing of latent transforming growth factor-beta binding protein-1. *FEBS Lett* 425: 281-285.
- Olaso E, Salado C, Egilegor E, Gutierrez V, Santisteban A, Sancho-Bru P, Friedman SL, Vidal-Vanaclocha F** (2003) Proangiogenic role of tumor-activated hepatic stellate cells in experimental melanoma metastasis. *Hepatology* 37: 674-685.

- Olofsson A, Ichijo H, Morén A, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CH** (1995) Efficient association of an amino-terminally extended form of human latent transforming growth factor-beta binding protein with the extracellular matrix. *J Biol Chem* 270: 31294-31297.
- Olofsson A, Miyazono K, Kanzaki T, Colosetti P, Engstrom U, Heldin CH** (1992) Transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 secreted by a human glioblastoma cell line. Identification of small and different forms of large latent complexes. *J Biol Chem* 267: 19482-19488.
- Ormerod AD, Herriot R, Davidson RJ, Sewell HF** (1990) Adult mastocytosis: an immunophenotypic and flow-cytometric investigation. *Br J Dermatol* 122: 737-744.
- Osborn M, Weber K** (1982) Immunofluorescence and immunocytochemical procedures with affinity purified antibodies: tubulin-containing structures. *Methods Cell Biol* 24: 97-132.
- Otto DA, Veech RL** (1980) Isolation of a lipocyte-rich fraction from rat liver nonparenchymal cells. *Adv Exp Med Biol* 132: 509-517.
- Oumard A, Hennecke M, Hauser H, Nourbakhsh M** (2000) Translation of NRF mRNA is mediated by highly efficient internal ribosome entry. *Mol Cell Biol* 20: 2755-2759.
- Pare JF, Roy S, Galarneau L, Belanger L** (2001) The mouse fetoprotein transcription factor (FTF) gene promoter is regulated by three GATA elements with tandem E box and Nkx motifs, and FTF in turn activates the Hnf3beta, Hnf4alpha, and Hnf1alpha gene promoters. *J Biol Chem* 276: 13136-13144.
- Pinkert CA, Ornitz DM, Brinster RL, Palmiter RD** (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.
- Pinzani M** (1995) Hepatic stellate (ITO) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte. *J Hepatol* 22: 700-706.
- Praaning-van Dalen DP, de Leeuw AM, Brouwer A, Knook DL** (1987) Rat liver endothelial cells have a greater capacity than Kupffer cells to endocytose N-acetylglucosamine- and mannose-terminated glycoproteins. *Hepatology* 7: 672-679.
- Ramadori G, Neubauer K, Odenthal M, Nakamura T, Knittel T, Schwöglers S, Meyer zum Büschenfelde KH** (1992) The gene of hepatocyte growth factor is expressed in fat-storing cells of rat liver and is downregulated during cell growth and by transforming growth factor-beta. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 739-742.
- Ramadori G, Saile B** (2002) Mesenchymal cells in the liver-one cell type or two? *Liver* 22: 283-294.
- Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK** (2003) Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 12: 1-11.
- Rappaport AM** (1976) The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Pathol* 157: 215-243.
- Rappaport AM, Borowy ZJ, Lougheed WM, Lotto WN** (1954) Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit; role in hepatic physiology and pathology. *Anat Rec* 119: 11-33.
- Recillas-Targa F, Bell AC, Felsenfeld G** (1999) Positional enhancer-blocking activity of the chicken beta-globin insulator in transiently transfected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14354-14359.
- Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G** (2002) Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken beta-globin insulator are separable activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6883-6888.
- Reeves HL, Friedman SL** (2002) Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 7: d808-d826.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A** (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18: 399-404.

- Rodriguez I, Matsuura K, Khatib K, Reed JC, Nagata S, Vassalli P** (1996) A bcl-2 transgene expressed in hepatocytes protects mice from fulminant liver destruction but not from rapid death induced by anti-Fas antibody injection. *J Exp Med* 183: 1031-1036.
- Rossant J** (2001) Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19: 477-482.
- Rossant J, Joyner AL** (1989) Towards a molecular-genetic analysis of mammalian development. *Trends Genet* 5: 277-283.
- Saharinen J, Hyytiäinen M, Taipale J, Keski-Oja J** (1999) Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev* 10: 99-117.
- Saharinen J, Keski-Oja J** (2000) Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell* 11: 2691-2704.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA** (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Sambrook J, Russell DW** (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanderson N, Factor V, Nagy P, Kopp J, Kondaiah P, Wakefield L, Roberts AB, Sporn MB, Thorgeirsson SS** (1995) Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2572-2576.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Sasse D, Spornitz UM, Maly IP** (1992) Liver architecture. *Enzyme* 46: 8-32.
- Sato Y, Tsuboi R, Lyons R, Moses H, Rifkin DB** (1990) Characterization of the activation of latent TGF-beta by co-cultures of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system. *J Cell Biol* 111: 757-763.
- Schleger C, Krebsfaenger N, Kalkuhl A, Bader R, Singer T** (2001) [Innovative cell culture methods in drug development]. *ALTEX* 18: 5-8.
- Schnabl B, Choi YH, Hagedorn CH, Bataller R** (2005) DNA microarrays and data mining to study hepatic fibrosis. *Methods Mol Med* 117: 359-369.
- Schnabl B, Hu K, Mühlbauer M, Hellerbrand C, Stefanovic B, Brenner DA, Schölmerich J** (2005) Zinc finger protein 267 is up-regulated during the activation process of human hepatic stellate cells and functions as a negative transcriptional regulator of MMP-10. *Biochem Biophys Res Commun* 335: 87-96.
- Schuler M, Dierich A, Chambon P, Metzger D** (2004) Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse. *Genesis* 39: 167-172.
- Schwartz RE, Linehan JL, Painschab MS, Hu WS, Verfaillie CM, Kaufman DS** (2005) Defined conditions for development of functional hepatic cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 14: 643-655.
- Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM** (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 109: 1291-1302.
- Senoo H** (2004) Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc* 37: 3-15.
- Shafritz DA, Oertel M, Menthena A, Nierhoff D, Dabeva MD** (2006) Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology* 43: S89-S98.
- Shi Y, Massagué J** (2003) Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113: 685-700.

- Shiple J, Mecham RP, Maus E, Bonadio J, Rosenbloom J, McCarthy RT, Baumann ML, Frankfater C, Segade F, Shapiro SD (2000) Developmental expression of latent transforming growth factor beta binding protein 2 and its requirement early in mouse development. *Mol Cell Biol* 20: 4879-4887.
- Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, Okita K, Zern MA (2004) Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant* 13: 197-211.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359: 693-699.
- Sinha S, Nevett C, Shuttleworth CA, Kielty CM (1998) Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix Biol* 17: 529-545.
- Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, Geerts A (1994) Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut* 35: 1509-1516.
- Smyth DG, Blumenfeld OO, Konigsberg W (1964) Reactions of N-ethylmaleimide with peptides and amino acids. *Biochem J* 91: 589-595.
- Snykers S, Vanhaecke T, Papeleu P, Luttun A, Jiang Y, Heyden YV, Verfaillie C, Rogiers V (2006) Sequential Exposure to Cytokines Reflecting Embryogenesis: The Key for In Vitro Differentiation of Adult Bone Marrow Stem Cells into Functional Hepatocyte-Like Cells. *Toxicol Sci* : Epub ahead of print.
- Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H (2002) Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev* 16: 2264-2273.
- Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A, Patapoutian A, Hampton GM, Schultz PG, Hogenesch JB (2002) Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4465-4470.
- Suzuki A, Nakauchi H, Kanda S, Shiroy A, Ouji Y, Birumachi J, Ueda S, Fukui H, Tatsumi K, Ishizaka S, Takahashi Y, Yoshikawa M (2002) Identification and propagation of liver stem cells In vitro differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells promoted by gene transfer of hepatocyte nuclear factor 3 beta. *Semin Cell Dev Biol* 13: 455-461.
- Suzuki A, Zheng Y, Kondo R, Kusakabe M, Takada Y, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H (2000) Flow-cytometric separation and enrichment of hepatic progenitor cells in the developing mouse liver. *Hepatology* 32: 1230-1239.
- Sztark F, Dubroca J, Latry P, Quinton A, Balabaud C, Bioulac-Sage P (1986) Perisinusoidal cells in patients with normal liver histology. A morphometric study. *J Hepatol* 2: 358-369.
- Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, Yoshida K, Furukawa F, Sugano Y, Matsushita M, Himeno Y, Inagaki Y, Inoue K (2002) Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. *Hepatology* 35: 49-61.
- Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J (1994) Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol* 124: 171-181.
- Tannour-Louet M, Porteu A, Vaultont S, Kahn A, Vasseur-Cognet M (2002) A tamoxifen-inducible chimeric Cre recombinase specifically effective in the fetal and adult mouse liver. *Hepatology* 35: 1072-1081.
- Tateaki Y, Ogawa T, Kawada N, Kohashi T, Arihiro K, Tateno C, Obara M, Yoshizato K (2004) Typing of hepatic nonparenchymal cells using fibulin-2 and cytoglobin/STAP as liver fibrogenesis-related markers. *Histochem Cell Biol* 122: 41-49.

- Teramoto K, Asahina K, Kumashiro Y, Kakinuma S, Chinzei R, Shimizu-Saito K, Tanaka Y, Teraoka H, Arai S** (2005) Hepatocyte differentiation from embryonic stem cells and umbilical cord blood cells. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 12: 196-202.
- Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K, Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T** (2005) Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology* 41: 836-846.
- Teutsch HF, Schuerfeld D, Groezinger E** (1999) Three-dimensional reconstruction of parenchymal units in the liver of the rat. *Hepatology* 29: 494-505.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM** (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Tosh D, Shen CN, Slack JM** (2002) Differentiated properties of hepatocytes induced from pancreatic cells. *Hepatology* 36: 534-543.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
- Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW** (1990) Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 10: 56-65.
- Tuchweber B, Desmoulière A, Bochaton-Piallat ML, Rubbia-Brandt L, Gabbiani G** (1996) Proliferation and phenotypic modulation of portal fibroblasts in the early stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest* 74: 265-278.
- Unsöld C, Hyytiäinen M, Bruckner-Tuderman L, Keski-Oja J** (2001) Latent TGF-beta binding protein LTBP-1 contains three potential extracellular matrix interacting domains. *J Cell Sci* 114: 187-197.
- Vassy J, Kraemer M, Chalumeau MT, Foucrier J** (1988) Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Differ* 24: 9-24.
- Vyas SK, Leyland H, Gentry J, Arthur MJ** (1995) Rat hepatic lipocytes synthesize and secrete transin (stromelysin) in early primary culture. *Gastroenterology* 109: 889-898.
- Wake K** (1971) "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat* 132: 429-462.
- Wang H, Gauthier BR, Hagenfeldt-Johansson KA, Iezzi M, Wollheim CB** (2002) Foxa2 (HNF3beta) controls multiple genes implicated in metabolism-secretion coupling of glucose-induced insulin release. *J Biol Chem* 277: 17564-17570.
- Wang SI, Mukhtar H** (2002) A high-efficiency translational control element with potential for cancer gene therapy. *Int J Oncol* 20: 1269-1274.
- Wanless IR** (2002) *Pathology of the liver*, MacSween RNM (ed). Churchill Livingstone, London. 539-73.
- Ward CM, Stern PL** (2002) The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 20: 472-475.
- Weiskirchen R, Moser M, Günther K, Weiskirchen S, Gressner AM** (2003) The murine latent transforming growth factor-beta binding protein (Ltbp-1) is alternatively spliced, and maps to a region syntenic to human chromosome 2p21-22. *Gene* 308: 43-52.
- Wells JM, Melton DA** (2000) Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 127: 1563-1572.
- Whittaker P, Kloner RA, Boughner DR, Pickering JG** (1994) Quantitative assessment of myocardial collagen with picrosirius red staining and circularly polarized light. *Basic Res Cardiol* 89: 397-410.
- Wilkie TM, Brinster RL, Palmiter RD** (1986) Germline and somatic mosaicism in transgenic mice. *Dev Biol* 118: 9-18.

- Winau, Hegasy, Weiskirchen, Weber, Cassan, Niemeyer, Sieling, Modlin, Liblau, Gressner, Kaufmann** (2006) Ito cells are novel antigen presenting cells. *Immunity* : in Revision.
- Wisse E** (1972) An ultrastructural characterization of the endothelial cell in the rat liver sinusoid under normal and various experimental conditions, as a contribution to the distinction between endothelial and Kupffer cells. *J Ultrastruct Res* 38: 528-562.
- Wisse E, van't Noordende JM, van der Meulen J, Daems WT** (1976) The pit cell: description of a new type of cell occurring in rat liver sinusoids and peripheral blood. *Cell Tissue Res* 173: 423-435.
- Xu JJ, Diaz D, O'Brien PJ** (2004) Applications of cytotoxicity assays and pre-lethal mechanistic assays for assessment of human hepatotoxicity potential. *Chem Biol Interact* 150: 115-128.
- Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S, Kato Y, Nakajima Y, Ishizaka S, 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.
- Yamada Y, Nishimoto E, Mitsuya H, Yonemura Y** (2006) In vitro transdifferentiation of adult bone marrow Sca-1+ cKit- cells cocultured with fetal liver cells into hepatic-like cells without fusion. *Exp Hematol* 34: 97-106.
- Yin W, Smiley E, Germiller J, Mecham RP, Florer JB, Wenstrup RJ, Bonadio J** (1995) Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem* 270: 10147-10160.
- Yull FE, Wallace RM, Clark AJ** (1995) Restricted tissue-specific but correct developmental expression mediated by a short human alpha 1AT promoter fragment in transgenic mice. *Transgenic Res* 4: 70-74.
- Zambrowicz BP, Imamoto A, Fiering S, Herzenberg LA, Kerr WG, 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.
- Zaret KS** (2001) Hepatocyte differentiation: from the endoderm and beyond. *Curr Opin Genet Dev* 11: 568-574.
- Zaret KS** (2002) Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 3: 499-512.
- Zaret KS, DiPersio CM, Jackson DA, Montigny WJ, Weinstat DL** (1988) Conditional enhancement of liver-specific gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9076-9080.
- Zhang W, Yatskievych TA, Baker RK, Antin PB** (2004) Regulation of Hex gene expression and initial stages of avian hepatogenesis by Bmp and Fgf signaling. *Dev Biol* 268: 312-326.
- Zhao R, Duncan SA** (2005) Embryonic development of the liver. *Hepatology* 41: 956-967.
- Zhao R, Fahs SA, Weiler H, Duncan SA** (2001) An efficient method to successively introduce transgenes into a given genomic locus in the mouse. *BMC Dev Biol* 1: 10.
- Zolfaghari R, Ross AC** (2000) Lecithin:retinol acyltransferase from mouse and rat liver. cDNA cloning and liver-specific regulation by dietary vitamin a and retinoic acid. *J Lipid Res* 41: 2024-2034.



## Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei

der Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach und Köln) für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der zur Durchführung benötigten Materialien,

Herrn Dr. Andreas Bosio (Miltenyi Biotec) und meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Ralf Weiskirchen (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Aachen) für die Betreuung dieser Arbeit und die gute Zusammenarbeit,

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Prof. h.c. Axel M. Gressner (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, RWTH Aachen) für die gute Zusammenarbeit,

Herrn PD Dr. Christoph Peterhänsel für die Übernahme des Korreferats,

Frau Dr. Bettina Peters (Miltenyi Biotec) und Frau Dr. Katrin Buss (BfArM) für die stete Diskussionsbereitschaft und Aufmunterung,

Herrn Dr. Falko Drews (Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, RWTH Aachen) für die gute Zusammenarbeit,

Frau Dipl. Ing. Alena Bencsik (Miltenyi Biotec) für die Oozyteninjektionen,

Frau Sabina Kaczmarzyk und Herrn Paul Colesar für die tolle Pflege der Mäuse,

Herrn Dr. Stefan Tomiuk (Miltenyi Biotec) für die Hilfe bei bioinformatischen Fragestellungen,

Herrn Dr. Markus Moser (Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried) für die Überlassung der *Itbp1*<sup>-/-</sup>-Maus,

Frau Sibille Sauer-Lehnen für die Präparation der HSC sowie die Hilfe beim Erlernen dieser Methode,

allen Mitarbeitern der Miltenyi Biotec GmbH und des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie (RWTH Aachen) für die Unterstützung und das tolle Arbeitsklima,

meiner Familie und meinen Freunden für die dauerhafte Unterstützung!

## Lebenslauf

Name Knöbel, Sebastian Mathias

Geburtsdatum 18.04.1977

Geburtsort Bonn

Eltern Irmgard Knöbel (geb. Mertens)  
Gottfried Knöbel

Staatsangehörigkeit deutsch

Wohnort Manderscheider Str. 6, 50937 Köln

Schulbildung 07/1983 bis 07/1987 Markus-Grundschule, Rösberg  
08/1987 bis 06/1996 St. Ursula-Gymnasium, Brühl  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung 10/1996 bis 12/2001 Studium der Biologie an der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn. Diplomarbeit im Institut für  
Pharmazeutische Biologie unter der Leitung von  
Frau Prof. Dr. G. M. König  
Prüfungsfächer: Genetik, Zellbiologie, Biochemie

07/2002 bis 12/2006 Promotionsarbeit bei der Miltenyi Biotec GmbH  
(MACS Molecular Business Unit, Köln)  
unter der Leitung von  
Herrn Dr. Andreas Bosio (Miltenyi Biotec GmbH, Köln) und  
Herrn PD Dr. R. Weiskirchen (Institut für Klinische Chemie und  
Pathobiochemie, RWTH Aachen)

Berufspraktika 02/2002 bis 06/2002 Praktikum bei der Memorec Stoffel GmbH, Köln  
(heute Miltenyi Biotec GmbH, MACS Molecular Business Unit, Köln)

Köln, den 01.12.2006

## Erklärung

Ich versichere eidesstattlich, dass ich diesen Promotionsantrag erstmalig einreiche und keine früheren Versuche einer Promotion unternommen habe.

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Dissertation selbstständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Hilfen in der Dissertation angegeben habe.

Ich erkläre, dass durch die Veröffentlichung als Dissertation der RWTH Aachen bestehende Schutzrechte - insbesondere Urheberrechte - nicht verletzt werden.

Köln, den 01.12.2006

Teile der vorliegenden Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht:

Sebastian Knöbel\* und Falko Drews\*, Markus Moser, Kai G. Muhlack, Christian Stoll, Andreas Bosio, Axel M. Gressner and Ralf Weiskirchen.

*Disruption of the latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 1 gene (*Ltbp-1*) causes subtle alteration in facial structure and reduced TGF- $\beta$  activity.*

\* gleichwertige Erstautorenschaft