

Aus dem Zentrum der Chirurgie des  
Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Klinik für Allgemeinchirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Encke)

**Untersuchungen zum Einfluß extrazellulärer  
Matrixkomponenten auf das Differenzierungsverhalten  
humaner Hepatozyten unter Berücksichtigung der  
Veränderungen von Zytoskelett-Proteinen und  
Oberflächenantigenen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereiches Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von  
Christoph Schick  
aus Köln

Frankfurt am Main, 2001

Dekan: Prof. Dr. med. G. von Jagow

Referent: Prof. Dr. med. B. H. Markus

Korreferent: Prof. Dr. J. Cinatl

Tag der mündlichen Prüfung: 14.3.2002

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung .....	5
1.1 Funktion der Leber.....	5
1.1.1 Physiologische Leberfunktion.....	5
1.2 Therapeutische Möglichkeiten bei gestörter Leberfunktion.....	6
1.2.1 Leber-Transplantation.....	6
1.2.2 Bio-Reaktoren zur passageren Übernahme der Leberfunktion.....	7
1.2.3 Hepatozyten-Transplantation.....	8
1.2.4 Weitere Einsatzgebiete für Hepatozyten.....	8
1.3 Problematik isolierter Hepatozyten - Isolationstechniken, Wachstumsverhalten, Aufrechterhaltung der Differenzierung.....	9
1.3.1 Isolation von Hepatozyten.....	9
1.3.2 Mitosehemmung isolierter Hepatozyten.....	9
1.3.3 Entdifferenzierung isolierter Hepatozyten.....	10
1.4 Aufgabenstellung.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Zellkulturen .....	13
2.1.1 Humane Hepatozyten.....	13
2.1.1.1 Gewebsperfusion.....	13
2.1.1.2 Zellseparation, Zellaufbereitung.....	15
2.1.1.3 Bestimmung von Zellvitalität und Zellausbeute.....	16
2.1.1.4 Modifikation der Perfusionsmethode.....	16
2.1.1.5 Aussaat der Zellkulturen.....	18
2.1.1.6 Kulturmedien.....	18
2.1.1.7 Herstellung der zweidimensionalen Extrazellulärmatrix- beschichtung.....	18
2.1.1.8 Herstellung der im Überstand gelösten Matrixfaktoren.....	19
2.2 Fluoreszenzanalytische Untersuchungen.....	20
2.2.1 Durchflußzytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS).....	20
2.2.1.1 Durchflußzytometrischer Nachweis intrazellulärer Zytokeratine.....	21
2.2.1.2 Nachweis von Integrinen mittels Durchflußzytometrie.....	22
2.3 Western Blot .....	23
2.3.1 Zellablösung.....	24
2.3.2 Lysierung und Proteinbestimmung.....	24
2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	26
2.3.4 Western Blot.....	28
2.3.5 Färbung der Nitrozellulosemembran.....	30
2.3.6 Lösungen und Puffer.....	34
3 Ergebnisse .....	37
3.1 Charakterisierung der Zellen nach Isolation.....	37
3.1.1 Charakterisierung der isolierten Zellen anhand des Zellskeletts.....	37
3.1.2 Charakterisierung der isolierten Zellen anhand des Integrinmusters.....	37
3.1.3 Charakterisierung der isolierten Zellen anhand exprimierter immu- modulatorischer Moleküle.....	38
3.2 Zeit-Expressions-Kurven der durchflußzytometrischen Analysen der Zytokeratine.....	41
3.2.1 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix (C/O).....	41
3.2.2 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (C/M).....	41

3.2.3 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen-I angereicherten Kultur-Mediums(C/C).....	44
3.2.4 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix (M/0).....	44
3.2.5 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen-I angereicherten Kultur-Mediums (M/C).....	46
3.2.6 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (M/M).....	46
3.2.7 Hepatozyten auf einer Laminin-Matrix (L/0).....	49
3.2.8 Hepatozyten auf einer Fibronectin-Matrix (F/0).....	49
3.2.9 Hepatozyten auf einer Laminin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Fibronectin angereicherten Kultur-Mediums (L/F).....	51
3.2.10 Hepatozyten auf einer Fibronectin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Laminin angereicherten Kultur-Mediums (F/L).....	51
3.2.11 Hepatozyten auf einer Laminin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Laminin angereicherten Kultur-Mediums (L/L).....	53
3.2.12 Hepatozyten auf einer Fibronectin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Fibronectin angereicherten Kultur-Mediums (F/F).....	53
3.3 Western Blot-Analyse der Zytokeratine.....	55
3.3.1 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix (M/0).....	55
3.3.2 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix (C/0).....	55
3.3.3 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen-I angereicherten Kultur-Mediums (M/C).....	58
3.3.4 Hepatozyten auf einer Collagen-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (C/M).....	58
3.3.5 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (M/M).....	61
3.3.6 Hepatozyten auf einer Collagen-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen angereicherten Kultur-Mediums (C/C).....	61
3.4 Zeitkurven für Integrine, ICAM-1, MHC-I und MHC-II.....	64
3.4.1 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix (M/0).....	64
3.4.1.1 Nichtstimulierte Hepatozyten.....	64
3.4.1.2 Stimulation mit PGE2.....	66
3.4.1.3 Stimulation mit PMA.....	68
3.4.1.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$ .....	70
3.4.2 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix (C/0).....	72
3.4.2.1 Nichtstimulierte Hepatozyten.....	72
3.4.2.2 Stimulation mit PGE 2.....	74
3.4.2.3 Stimulation mit PMA.....	76
3.4.2.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$ .....	78
3.4.3 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit Collagen-I angereicherten Kulturmediums (M/C).....	80
3.4.3.1 Nichtstimulierte Hepatozyten.....	80
3.4.3.2 Stimulation mit PGE 2.....	82
3.4.3.3 Stimulation mit PMA.....	84
3.4.3.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$ .....	86
3.4.4 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit Matrigel angereicherten Kulturmediums (C/M).....	88
3.4.4.1 Nichtstimulierte Hepatozyten.....	88
3.4.4.2 Stimulation mit PGE2.....	90
3.4.4.3 Stimulation mit PMA.....	92
3.4.4.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$ .....	94

3.4.5 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit Matrigel angereicherten Kulturmediums (M/M).....	96
3.4.5.1 Nichtstimulierte Hepatozyten.....	96
3.4.5.2 Stimulation mit PGE 2.....	98
3.4.5.3 Stimulation mit PMA.....	100
3.4.5.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$ .....	102
3.4.6 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit Collagen-I angereicherten Kulturmediums (C/C).....	104
3.4.6.1 Nichtstimulierte Hepatozyten.....	104
3.4.6.2 Stimulation mit PGE 2.....	106
3.4.6.3 Stimulation mit PMA.....	108
3.4.6.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$ .....	110
4. Diskussion .....	125
4.1 Einleitung .....	125
4.2 Hepatozytenisolation.....	125
4.3 Proliferation .....	126
4.4 Differenzierung.....	139
4.5 Extrazelluläre Matrix.....	133
4.6 Zytoskelett .....	137
4.7 Integrine .....	140
5. Ausblick .....	144
6. Zusammenfassung.....	145
7. Literaturverzeichnis.....	147

# 1 Einleitung

## 1.1 Funktion der Leber

### 1.1.1 Physiologische Leberfunktion

Die Leber stellt den zentralen Ort für viele Stoffwechselprozesse des menschlichen Körpers dar. Insgesamt sind über 5000 verschiedene Funktionen der mindestens 7 beteiligten Zelltypen der Leber beschrieben (LaBrecque, 1994), darunter Auf- und Abbauprozesse im Bereich des Zucker-, Fett- und Eiweißstoffwechsels. So stellt die Leber einen zentralen Speicherort für im Körper benötigtes Glykogen dar, dessen Fehlen oder Überproduktion wie bei der Glykogenose II (Morbus Pompe) zu schweren Erkrankungen führen kann.

Fettstoffwechselstörungen wirken sich häufig auf die Leber aus, da die Leber einen wichtigen Fettspeicher und den Synthese- und Abbauort für Nahrungsfettsäuren sowie Cholesterin darstellt. Konsequenterweise kommt der Kontrolle des hepatischen Lipidmetabolismus eine zentrale Rolle im Rahmen der Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen zu.

Weiterhin fungiert die Leber als wichtigster Produktionsort für Proteine, die in der gesamten Körperhomöostase benötigt werden. Mangel an Albumin kann so beispielsweise zu Ödemen, Hypotonie und Leistungsminderung führen, ein Mangel an Blutgerinnungsfaktoren hingegen zu lebensbedrohlichen Blutungen. (Bucher and Wartenburg, 1989; Saito *et al.*, 1983).

Oxidations- und Konjugationsprozesse sowie die Exkretion körpereigener wie körperfremder Stoffe bilden einen vierten Bereich der vielfältigen Aufgaben der Leber. Hierbei zählt die Oxidation über mischfunktionelle Cytochrom P450-Oxidasen zu den bekanntesten Funktionen. (Gumucio, 1989)

Obwohl vielfältige Störungen der Leberfunktion bekannt sind, ist die Zahl der möglichen Reaktionsweisen der Leber auf schädigende Einflüsse begrenzt. So kann ein akutes Leberversagen infolge von Virushepatitiden, infolge von Hepatotoxinen wie Paracetamol oder  $\alpha$ -Amanitin sowie aufgrund seltenerer Ursachen auftreten. Dabei kann die Leberfunktion im Rahmen eines Leberzerfallskomas innerhalb weniger Tage oder Wochen vollständig zum Erliegen kommen und die typischen Folgen Ikterus, Gerinnungsstörungen sowie Bewußtseinsstörungen nach sich ziehen.

Chronisches Leberversagen hingegen tritt meist im Rahmen zirrhotischen Leberumbaus auf und ist am häufigsten auf Alkoholabusus, chronische Hepatitiden sowie seltenerer Ursachen wie

primäre biliäre Zirrhose oder  $\alpha$ 1-Antitrypsin-Mangel zurückzuführen. Klinisch imponieren Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit oder Leistungsminderung, Leberhautzeichen wie Naevi aranei oder Ikterus, hormonelle Störungen mit Gynäkomastie beim Mann und Menstruationsstörungen bei der Frau sowie im Leberausfallskoma die oben bereits erwähnten Gerinnungs- oder Bewußtseinsstörungen.

Therapeutisch können konservative Maßnahmen wie die Bekämpfung der Virushepatitiden oder des Alkoholabusus einem großen Teil der Patienten helfen. Ein weiterer Teil der Patienten verfügt jedoch über eine nur noch sehr eingeschränkte Leberfunktion und ist trotz der bemerkenswerten regenerativen Kapazität der Leber, die einen Verlust von 2/3 der Organmasse innerhalb von 8 Tagen zu kompensieren vermag (Stamatoglou and Hughes, 1994), auf weitere supportive Maßnahmen angewiesen. Hierbei haben sich in den letzten Jahren zunehmend neue Möglichkeiten ergeben, um die Leberfunktion zu stabilisieren und zu verbessern.

## **1.2 Therapeutische Möglichkeiten bei gestörter Leberfunktion**

### **1.2.1 Leber-Transplantation**

Die Transplantation von Lebern wird seit 1963 zur Wiederherstellung der Leberfunktion durchgeführt. Derzeit umfassen die Indikationen zur Lebertransplantation vor allem fortgeschrittene chronische Lebererkrankungen, fulminantes oder subfulminantes Leberversagen und bestimmte metabolische Erkrankungen. Primäre Lebermalignome können in frühen Stadien ebenfalls mit einer Transplantation behandelt werden, jedoch stellen fortgeschrittene primäre Lebermalignome oder sekundäre, metastatische Malignommanifestationen in der Leber Kontraindikationen der Lebertransplantation dar.

Die Nachsorge der Patienten ist bestimmt durch die Notwendigkeit einer lebenslangen Therapie mit immunsupprimierenden Medikamenten zur Prävention von Abstoßungsreaktionen. Diese können vom primären Transplantatversagen im Rahmen einer perakuten Abstoßungsreaktion über akute inflammatorische Veränderungen des Endothels, der Gallenwege und der Hepatozyten selbst bis zu chronischen Abstoßungsreaktionen im Rahmen des „vanishing bile duct syndrome“ reichen. Bei viraler Genese der Leberzirrhose kann zudem ein Rezidiv der Grundkrankheit unter Immunsuppression die Situation des Patienten verschlechtern. Diese Komplikationen können akut oder chronisch zum Transplantatversagen führen, welches sei-

nerseits nur durch eine erneute Lebertransplantation behandelt werden kann.

### **1.2.2 Bio-Reaktoren zur passageren Übernahme der Leberfunktion**

Der Durchführung von Transplantationen steht ein Mißverhältnis zwischen verfügbaren Organen und Patienten, die ein solches benötigen, entgegen. So wurden im Jahre 1999 in den USA 4.697 Lebern transplantiert, hingegen standen etwa 14.000 Patienten auf der Warteliste für Lebertransplantationen (Harper *et al.*, 1999).

Zur Lösung dieser Problematik sind in den letzten Jahren vermehrt Anstrengungen zur Entwicklung von Leber-Ersatz-Systemen unternommen worden (Bader *et al.*, 1995a; Bader *et al.*, 1995b; Demetriou *et al.*, 1995; Gerlach *et al.*, 1994; Nyberg *et al.*, 1992; Rozga *et al.*, 1993). Diese kamen hauptsächlich bei Fällen eines akuten Leberversagens zum Einsatz und sollten die Lebersynthese- und Leberabbaufunktionen bis zu einer im Anschluß daran erfolgenden Lebertransplantation aufrechterhalten (Busse *et al.*, 1999). Prinzipiell bestehen diese Systeme aus einem extrakorporalen Behältnis für ca. 200g aus Lebergewebe isolierten Hepatozyten (entspricht ca.  $2 \cdot 10^{10}$  Hepatozyten), die meist in ein Netz von Hohlfasern integriert sind, und einem Anschluß an den Kreislauf des Patienten. Eine zusätzliche Sauerstoffzufuhr wird in einigen Geräten ebenfalls bereitgestellt. Hepatozyten wurden aufgrund der schon beschriebenen Organknappheit meist aus Schweinelebern gewonnen, die jedoch eine Reihe von Nachteilen aufweisen. So können tierische Proteine ihre Aufgaben im Menschen meist nicht in vollem Umfang wahrnehmen, zum Beispiel im Bereich der Blutgerinnung oder der Immunabwehr durch das Komplementsystem. Weiterhin können tierische Proteine Unverträglichkeitsreaktionen induzieren. Von weiterer Bedeutung ist die Gefahr der xenogenen Übertragung von Viren. Die Kenntnisse über die möglicherweise artübergreifende Pathogenität animalischer Viren sind derzeit noch begrenzt.

Klinische Studien mit humanen Hepatozyten sind aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit der Zellen nur eingeschränkt durchgeführt worden. So berichten Busse et al. vom Einsatz humaner Hepatozyten im Bioreaktor zur Überbrückung eines Leberversagens bis zu einer anschließenden Lebertransplantation. Hierbei wurden Überlebenszeiten bis zu 3 Tagen erreicht (Busse *et al.*, 1999), in einem Falle jedoch auch die vollständige Genesung des Patienten ohne die Notwendigkeit einer Transplantation. (Chen *et al.*, 1997; Watanabe *et al.*, 1997).

### 1.2.3 Hepatozyten-Transplantation

Alternativ zum Einsatz von Leber-Ersatz-Systemen wurde in den letzten Jahren zunehmend der Einsatz von intrakorporalen Hepatozyten-Transplantaten, bestehend aus von Lebergewebe isolierten Zellen erprobt. So konnten Groth et al. (Groth *et al.*, 1977) bereits 1977 eine Erniedrigung des Bilirubinspiegels bei Ratten mit einem angeborenen UDP-Glucuronyltransferase-Defekt nachweisen, was in den folgenden Jahren auch Uyama (Uyama *et al.*, 1993) gelang. Die angeborene Analbuminämie, die bei der Nagase-Ratte vorliegt, konnte in weiteren Experimenten von Demetriou (Demetriou *et al.*, 1986), Lilja (Lilja, 1998) und Rozga (Rozga *et al.*, 1995) nach Hepatozyten-Transplantation ebenfalls positiv beeinflusst werden.

Zwischenzeitlich konnten auch mehrfach Hepatozytentransplantationen beim Menschen unter ähnlichen Fragestellungen durchgeführt werden. So konnte ein zehnjähriges Kind mit Crigler-Najjar-Syndrom I (Fox *et al.*, 1998) durch Gabe der Hepatozytenmenge, die einem Fünftel der Lebermasse eines gleichaltrigen Kindes entspricht, behandelt werden, worauf es zu einer deutlichen Senkung des unkonjugierten Bilirubins kam.

In einer weiteren Studie wurde untersucht, ob eine Hepatozytentransplantation zur Überbrückung eines akuten Leberversagens hilfreich sein könne. Erste Ergebnisse wiesen dabei auf ein längeres Überleben der transplantierten Patienten hin, da 3 von 5 Patienten im Anschluß an eine Hepatozytentransplantation einer Lebertransplantation zugeführt werden konnten und diese um mehr als 20 Monate überlebten, während alle Kontrollpatienten ohne Hepatozytentransplantation vor Durchführung einer Lebertransplantation starben (Strom *et al.*, 1997).

## **1.2.4 Weitere Einsatzgebiete für Hepatozyten**

Weitere klinische und klinisch-theoretische Einsatzmöglichkeiten von Hepatozytenkulturen bestehen in der somatischen Gentherapie mittels gentechnisch veränderter Hepatozytenkulturen (Ott *et al.*, 2000; Strain, 1994) und der Verwendung von Hepatozytenkulturen zur Toxizitätstestung von Pharmaka (Cross and Bayliss, 2000; Maier, 1988).

## **1.3 Problematik isolierter Hepatozyten - Isolationstechniken, Wachstumsverhalten, Aufrechterhaltung der Differenzierung**

### **1.3.1 Isolation von Hepatozyten**

Die genannten Anwendungen der Hepatozyten in Form von Leber-Unterstützungssystemen und Zelltransplantaten lassen erkennen, daß für eine erfolgreiche Therapie eine Versorgung der Patienten mit Hepatozyten in ausreichender Quantität und hoher Qualität über lange Zeiträume notwendig ist. Demgegenüber stehen jedoch Probleme bei der Gewinnung einer ausreichenden Zellmenge, bei der Induktion der Mitose der Hepatozyten *in vitro* sowie zusätzlich Schwierigkeiten bei der Erhaltung eines differenzierten Funktionszustandes.

Das Problem der Gewinnung von Hepatozyten wird seit den 60er Jahren intensiv bearbeitet (Zuckerman *et al.*, 1967), jedoch waren anfangs erreichte Zellausbeuten noch sehr gering. Eine Erhöhung der Zellzahl wurde durch die Perfusionsmethode, wie Berry und Friend sie zuerst (Berry and Friend, 1969) beschrieben und Seglen sie 1976 (Seglen, 1976) modifizierte, möglich. Seither wurde die Methode vielfach modifiziert, um die Effizienz immer weiter zu erhöhen (Reese and Byard, 1981, Schroder *et al.*, 1994), so daß derzeit mehr als  $3 \cdot 10^6$  Hepatozyten pro Gramm Lebergewebe und mehr als  $10^9$  Hepatozyten pro Resektat erreicht werden können. (Strom *et al.*, 1999; Traiser *et al.*, 1994)

### **1.3.2 Mitosehemmung isolierter Hepatozyten**

Obwohl die Leber *in vivo* über ein außerordentliches Regenerationspotential verfügt, ist die mitotische Aktivität von Hepatozyten in Zellkulturen nur sehr gering (LaBrecque, 1994, Seglen, 1997, Kitten and Ferry, 1998). Verschiedene Ansätze zum Überführen von Hepato-

zyten aus der G0 in die G1-Phase sind beschrieben worden. So weist Michalopoulos auf den schnellen Anstieg der Serumkonzentration des „hepatocyte growth factor“ nach 2/3-Hepatektomie hin und schließt auf die Notwendigkeit des HGF im Regenerationsprozeß der Leber (Michalopoulos and Zarnegav, 1992). Francavilla beschreibt die wachstumsstimulierenden Faktoren Insulin, ALR, IGF-II, TGF- $\alpha$  und HGF und demonstriert die Schwierigkeit, einen einzelnen, allein für das Wachstum verantwortlichen Faktor zu identifizieren (Francavilla *et al.*, 1994). Diehl *et al.* (Diehl and Rai, 1996), Fausto *et al.* (Fausto *et al.*, 1995), Cressmann *et al.* (Cressman *et al.*, 1996) sowie Takeishi (Takeishi *et al.*, 1999) greifen dieses Problem auf, jedoch konnte eine überzeugende, klinisch einsetzbare Methode bis heute nicht beschrieben werden.

Andere Ansätze deuten auf eine Regeneration der Hepatozyten aus Stammzellen hin. Gordon *et al.* (Gordon *et al.*, 2000) beschreiben die Regeneration von Hepatozyten aus Hepatozyten selbst, aus periportal gelegenen, als „oval cells“ bezeichneten Zellen sowie aus kleinen, im normalen Leberparenchym verteilten hepatozytenähnlichen Zellen. Jedoch ist bis heute unklar, welcher Zelltyp unter vorgegebenen Bedingungen am meisten zur Wiedererlangung des ursprünglich vorhandenen Parenchyms beiträgt. (Alison *et al.*, 1997a; Alison *et al.*, 1997b; Anilkumar *et al.*, 1995; Gordon *et al.*, 2000; Omori *et al.*, 1997; Sarraf *et al.*, 1994; Sell, 1997; Sirica, 1995; Tee *et al.*, 1996; Yin *et al.*, 1999)

### **1.3.3 Entdifferenzierung isolierter Hepatozyten**

Ein weiteres Problem im Rahmen der Kultivierung isolierter Hepatozyten bildet die rasche Entdifferenzierung der Zellen. Morphologisch zeigen Hepatozyten *in vivo* eine polygonale Erscheinung, die sich unter Zellkulturbedingungen ebenfalls ausbildet. Im Rahmen einer längeren Zellkultur jedoch nehmen die Hepatozyten eine flache, langgestreckte Form an und erinnern hierbei an fibroblastenähnliche Strukturen.

Ultrastrukturell kommt es im Rahmen dieser Dedifferenzierungsprozesse zu einem fortschreitenden Verlust an Zellorganellen, so nehmen die Zahl der Mitochondrien und die Menge an glattem und rauhem endoplasmatischen Retikulum deutlich ab. Intrazelluläre Mikrofilamente nehmen an Menge zu und lokalisieren sich insbesondere unterhalb der Zellmembran. (Knop *et al.*, 1995).

Weiterhin wird eine *de-novo*-Expression von Zytokeratin 19 (Block *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1995), welches typischerweise in Gallengangsstrukturen vorkommt, sowie von Vimentin (Pagan *et al.*, 1995; Pagan *et al.*, 1999), das in mesenchymalen Zellen exprimiert wird, beschrieben. Die Sekretion hepatozytenspezifischer Proteine verringert sich, im Falle von Albumin innerhalb von 14 Tagen bis auf fast nicht mehr nachweisbare Werte (Sudhakaran *et al.*, 1986).

Für eine klinische Anwendung jedoch besteht die Notwendigkeit, differenzierte Zellkulturen, die sowohl hinsichtlich ihrer Zellzahl wie auch bezüglich der Syntheseleistung und des Zytoskeletts konstant sind, zu verwenden. Hierbei konnten mehrere Autoren einen stabilisierenden Einfluß der extrazellulären Matrix auf Hepatozytenkulturen nachweisen.

Eine mögliche Erklärung für den stabilisierenden Effekt der extrazellulären Matrix bietet die Beobachtung, daß Veränderungen der Zellarchitektur die Differenzierung von Zellen beeinflussen kann (Ben-Ze'ev, 1986).

So fanden Depreter *et al.* (Depreter *et al.*, 2000) eine Reduktion der Anzahl an hepatozytischen Peroxisomen sowie eine Reduktion der peroxisomalen Enzyme Katalase und Glutathion-S-Transferase in Hepatozyten, die als Rasen auf einem basalen Kollagen-Gel (sog. „single gel technique“) ausgesät worden waren. Hingegen konnten physiologische Werte an Peroxisomen sowie peroxisomalen Enzymen in Hepatozyten gemessen werden, die sich zwischen 2 Kollagen-Gelen befanden (sog. „Sandwichansatz“).

Bader *et al.* (Bader *et al.*, 1996) fanden eine vermehrte Expression von Cytochrom P 450 3A in Hepatozyten-Sandwich-Kulturen gegenüber Hepatozyten, die in single-gel-Technik ausplattiert worden waren. Außerdem konnten sie eine physiologische polygonale Morphologie der Hepatozyten in Sandwich-Kulturen gegenüber abgeflachten Hepatozyten auf einzelnen Gelen nachweisen.

Knop *et al.* (Knop *et al.*, 1995) konnten in einem ähnlichen Versuchsansatz eine vermehrte Expression von Albumin in Sandwich- gegenüber der single-gel-Technik detektieren. Weiterhin konnten sie eine erhaltene Struktur der interzellulären Gallengänge, des endoplasmatischen Retikulums sowie der intrazellulären Intermediärfilamente im Sandwich-Ansatz belegen, während erstere in single-gel-Technik deutlich abnahmen und die Intermediärfilamente unterhalb der Zellmembran ausgeprägte Aggregate formten.

Blaheta *et al.* (Blaheta *et al.*, 1998a; Blaheta *et al.*, 1998b) konnten die unterschiedliche Expression der intrazellulären Intermediärfilamente in Abhängigkeit von der verwendeten extrazellulären Matrix zeigen und die Überlegenheit eines dreidimensionalen Kollagen-Sandwichan-

satzes gegenüber der single-gel-Technik darlegen.

Rana et al. (Rana *et al.*, 1994) konnten unterschiedliche Differenzierungszustände kultivierter Hepatozyten abhängig von verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix demonstrieren. So konnten sie auf Kollagengelen eine vermehrte Synthese der Transkriptionsfaktoren c-jun und AP-1 nachweisen, auf einer basalmembranähnlichen Matrix, gewonnen aus dem Englebreth-Holm-Swarm-Tumor, hingegen ein nahezu normales Transkriptionsverhalten.

Bhadriraju et al. (Bhadriraju and Hansen, 2000) konnten schließlich zeigen, daß die Zellmorphologie sich mittels synthetischer Proteine für bestimmte Zelloberflächenrezeptoren selektiv beeinflussen läßt. Hierbei weisen diese Integrine genannten Zelloberflächenproteine eine Bindungsspezifität für Proteine auf, die das sogenannte RGD-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat, aufweisen.

## 1.4 Aufgabenstellung

Der klinische Einsatz von Hepatozyten im Sinne von Leberersatzsystemen oder im Rahmen einer Hepatozytentransplantation ist derzeit noch mit Problemen behaftet. Der Problematik der Differenzierung kommt dabei eine gewichtige Rolle zu, da sie über den Langzeiterfolg der genannten Maßnahmen entscheidet. Verschiedene Untersuchungen konnten einen Einfluß der extrazellulären Matrix auf das Differenzierungsverhalten von Hepatozyten *in vitro* nachweisen. Die folgenden Untersuchungen sollten den Einfluß verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix auf das Differenzierungsverhalten von humanen Hepatozyten verdeutlichen. Hierbei sollte die Differenzierung anhand der Veränderung von zytoskelettalen Proteinen, insbesondere der für Epithelien spezifischen Zytokeratine, bestimmt werden, zumal Veränderung des Zytokeratinmusters bei inflammatorischen und neoplastischen Läsionen bekannt sind. In einer zweiten Versuchsreihe sollten Oberflächenmoleküle, hierbei insbesondere die für bestimmte Zelltypen spezifischen Integrine, untersucht werden, um einen zweiten Marker für das Vorliegen von Dedifferenzierungserscheinungen zu etablieren. Weiterhin sollte die Stimulationsfähigkeit der Integrine durch Phorbol ester oder Prostaglandine als Marker für die Aktivität der Zelle bestimmt werden. Zusätzlich sollte eine mögliche Korrelation zwischen den Veränderungen des Zytoskeletts wie den Veränderungen der Zelloberflächenmolekülen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkulturen

#### 2.1.1 Humane Hepatozyten

Humane Hepatozyten wurden aus Gewebeproben isoliert, die im Rahmen von Tumorresektionen der Leber anfielen. Die Resektate sollten dabei ein Gewicht von mehr als 50 g haben, ein möglichst großes Areal sollte von Glissonscher Leberkapsel umgeben sein und der tumorös veränderte Anteil mußte mit einem Sicherheitsabstand von mindestens 1,5 cm abtrennbar sein. Die entnommenen Gewebeproben wurden steril in ein ebenfalls keimfreies Transportgefäß mit Transportmedium überführt. Das Transportmedium setzte sich dabei zusammen aus Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco Laboratories, Karlsruhe) mit 2% (v/v) HEPES-Puffer (Seromed, Berlin) sowie 50 IE Heparin/ml (Liquemin N 5000, Hoffmann-LaRoche, Basel, Schweiz). Mit der Aufbereitung des Lebergewebes wurde sofort nach Gewebeentnahme begonnen.

##### 2.1.1.1 Gewebesperfusion

Die Hepatozytenisolation erfolgte mittels einer Enzymlösung, die durch Lebergefäße perfundiert wurde. Es handelte sich dabei um eine modifizierte Perfusionsmethode nach Seglen. Die Perfusion wurde unter sterilen Bedingungen (Sterile Werkbank Gelaire BSB 6A, Flow Laboratories GmbH, Meckenheim) in einer Glas-Petrischale (Durchmesser 10 cm) unternommen.

Die Perfusion der Leber erfolgte in 4 Schritten:

Schritt 1: Vorbereitung der Perfusionslösungen: EGTA-Perfusionslösung und Calciumchlorid-Perfusionslösung wurden angesetzt (s. Kasten). Beide Lösungen wurden dann im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Schritt 2: Vorbereitung des Perfusionssystems: Eine Rollerpumpe (Masterflex L/S 7523-15, Cole-Parmer Instruments Co., Illinois, USA) mit einem Mehrkanalpumpenkopf (Novodirekt, Kehl am Main) wurde mit einem Schlauchsystem (Silikonschlauch, Innendurchmesser 4,8 mm) verbunden. An dieses waren zur Verlängerung zwei weitere Injektomatleitungen (Braun, Mel-

sungen) angeschlossen, die in einem Wasserbad mit einer Temperatur von 39 °C lagen und zur Erwärmung des Perfusates dienten. Die Injektomatleitungen wurden mit einer Knopfkanüle verbunden.

Schritt 3: Zur Injektion der Enzymlösung wurde ein großes, möglichst zentral gelegenes venöses Gefäß mit der Knopfkanüle kanüliert. Das Blutgefäß wurde dabei so ausgewählt, daß während der Perfusion ein möglichst großes Volumen des Resektates abblatte und somit blutleer wurde. Weitere Blutgefäße wurden mit Histoacrylkleber (Braun, Melsungen) verklebt, um den Verbleib des Perfusates im Gewebe zu gewährleisten und Abflüsse zu vermindern.

Schritt 4: Perfusion mit EGTA-Perfusionslösung: 30 ml der EGTA-Perfusionslösung wurden über das Schlauchsystem in das Leberresektat perfundiert und nach Wiederaustritt verworfen. Anschließend wurde die übrige EGTA-Perfusionslösung rezirkulierend in das Gewebe perfundiert, d.h. aus dem Gewebe austretendes Perfusat über den in die Glas-Petrischale gelegten Silikonschlauch dem Gewebe wieder zugeführt. Die Flußgeschwindigkeit wurde dabei bis auf 40 ml/min erhöht, die Perfusionsdauer betrug 15 min.

Schritt 5: Kollagenase-Perfusion: Zuerst wurde der Calciumchlorid-Lösung Kollagenase Typ IV (Sigma Chemical Co., München) über einen Sterilfilter (Minisart, Sartorius, Göttingen) bis zu einer Konzentration von 0,075 % zugesetzt. 50 ml dieser Lösung wurden dann in die Gewebeprobe perfundiert und anschließend verworfen. Die übrigen 50 ml Perfusionslösung wurden danach für 15 min rezirkulierend in die Leberprobe perfundiert. Die Flußgeschwindigkeit wurde dabei von 40 ml/min bis auf 80 ml/min gesteigert. (Abb. 1)

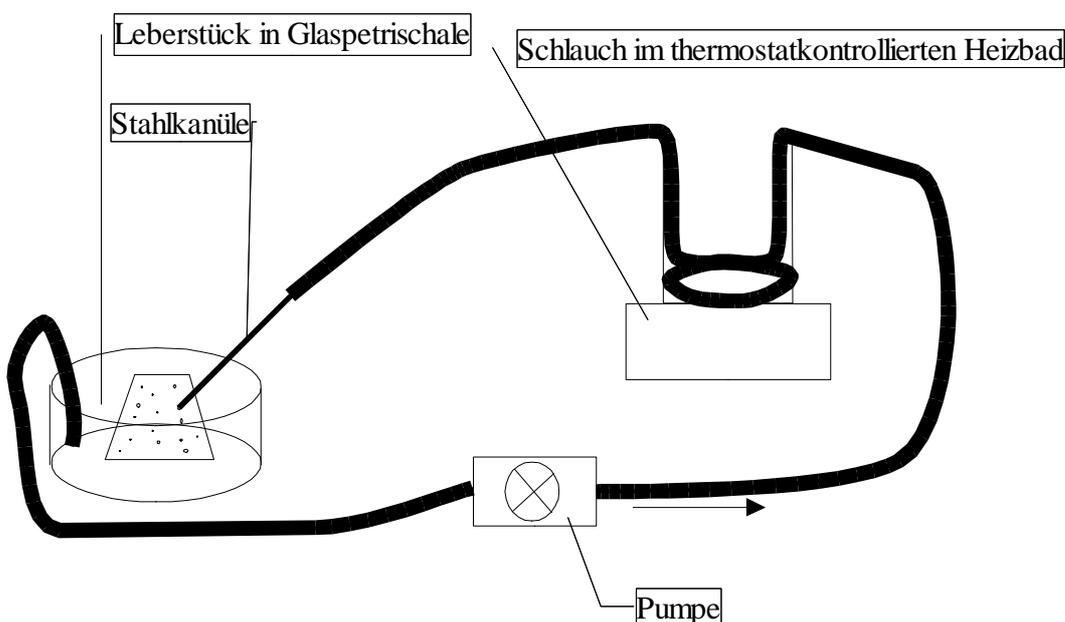


Abbildung 1

Folgende Lösungen wurden für die Perfusionsmethode benötigt:

- 1) EGTA-Perfusionslösung: HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  mit 0,5 mM EGTA (Sigma Chemical Co, München)
- 2) Calciumchlorid-Perfusionslösung: HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  mit Zusatz von 4 mM  $\text{CaCl}_2$  (AppliChem, Darmstadt) und 0,075 % Kollagenase Typ IV (Sigma Chemical Co. München)
- 3) Initiale Perfusionslösung: HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  mit 50 IE Heparin/ml (Liquemin, Hoffmann-LaRoche)
- 4) Spül-Perfusionslösung: HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$

### 2.1.1.2 Zellseparation, Zellaufbereitung

Nach der enzymatischen Andauung der Gewebeprobe wurde die umgebende Kapsel mit einem Skalpell inzidiert und die entweichende Gewebemasse schonend durch häufiges auf- und abpipettieren weiter mechanisch fragmentiert. Verwendet wurden dabei 100 ml HBSS mit 2% (v/v) HEPES-Puffer. Um größere Gewebefragmente zu entfernen, wurde die Gewebemasse sukzessiv durch 3 Metallfilter mit jeweils geringer werdender Porengröße von 1000, 500 und 250  $\mu\text{m}$  filtriert und der Überstand verworfen. Die erhaltene Zellsuspension wurde zum Schluß durch ein Zellsieb (Falcon Zellsieb, Porengröße 70  $\mu\text{m}$ , Becton Dickinson, Heidelberg) filtriert, um eine möglichst gute Einzelzellsuspension zu erhalten. Diese wurde sodann in einer Zentrifuge (Varifuge RF, Heraeus, Hanau) für 5 min bei 28 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das erhaltene Zellpellet in HBSS mit 2% (v/v) HEPES-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde vorsichtig über eine Percoll®-Lösung mit der Dichte 1,065 g/ml (Biochrom) überschichtet und dann 10 min bei 175 g zentrifugiert. Nicht-vitale Hepatozyten sowie nicht-parenchymatöse Zellen verblieben bei diesem Zentrifugationsschritt im Überstand, während vitale Hepatozyten sich als Pellet abschieden. Das erhaltene Pellet wurde in HBSS mit 2% HEPES-Puffer resuspendiert und noch einmal zur Entfernung von toxischer Percoll®-Lösung bei 28 g zentrifugiert. Im Anschluß daran wurde das Pellet bis zur Verwendung der Hepatozyten in HBSS mit 2% HEPES-Puffer resuspendiert.

### 2.1.1.3 Bestimmung von Zellvitalität und Zellausbeute

Zellvitalität und Zellausbeute wurden mit der Trypanblau-Methode analysiert. Bei dieser Methode wird eine Zellsuspension mit einer 0,4 % Trypanblau-Lösung (Trypan Blue Stain 0,4%, Gibco) im Verhältnis 1:10 (v/v) versetzt und nach 2 min lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer analysiert. Tote Zellen färben sich bei dieser Methode blau an, da der Farbstoff wegen eines Membrandefektes die Zellmembran permeieren kann. Vitale Zellen hingegen bleiben ungefärbt. Zur Zellzahlbestimmung werden 4 Quadrate mit einem Einzelvolumen von jeweils 0,1 µl ausgezählt. Die Zellausbeute läßt sich dann wie folgt aus dem Volumen der Zählkammer errechnen:

$$\frac{\text{Zellzahl in 4 Quadraten}}{4} \cdot 10 \cdot 1000 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die relative Zellvitalität läßt sich dann errechnen als das Verhältnis

$$\frac{\text{Vitale Zellen}}{\text{Tote + Vitale Zellen}} = \text{Vitalität in Prozent}$$

### 2.1.1.4 Modifikation der Perfusionsmethode

Die oben angegebene Perfusionsmethode wurde in einigen Punkten verändert, um die Zellausbeute zu erhöhen. So wurde die Gewebeprobe mit heparinhaltiger initialer Perfusionslösung vorgespült, um eine verbesserte Entfernung noch vorhandener Blutkoagel zu ermöglichen. Die EGTA-Perfusionslösung wurde nicht erwärmt, um die warme Ischämiezeit während der Perfusion zu verkürzen. Zusätzlich wurde zwischen EGTA- und Kollagenase-Perfusion eine Zwischenperfusion mit EGTA-freier Spül-Perfusionslösung durchgeführt. Dieser Schritt diente zur Entfernung noch vorhandener EGTA-haltiger Flüssigkeit, die die zugegebenen Calcium-Ionen bei der darauffolgenden Kollagenase-Perfusion komplexieren würde. Die Flußrate der Kollagenaselösung wurde 3-5 mal im Lauf der Perfusion verändert, um das Bindegewebe durch mechanische Druckveränderungen zusätzlich aufzulockern.

### **2.1.1.5 Ausaat der Zellkulturen**

Nach Bestimmung der Zellzahl und Zellvitalität wurden die Hepatozyten ausgesät. Für fluoreszenzanalytische Untersuchungen wurden dabei  $5 \times 10^6$  Hepatozyten in 5 ml Kulturmedium in Kulturflaschen (Falcon Primaria Tissue Culture Flask, Becton Dickinson, Heidelberg) mit einer Oberfläche von  $25 \text{ cm}^2$  (entsprechend  $2 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ) verwandt, für Western Blot-Analysen  $10 \times 10^6$  Hepatozyten in 10 ml Kulturmedium in Kulturflaschen (Becton Dickinson) mit einer Oberfläche von  $75 \text{ cm}^2$  (entsprechend  $1,3 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ). Die Böden der Kulturflaschen waren vorher mit einer extrazellulären Matrix beschichtet worden (s. 2.1.1.7).

### **2.1.1.6 Kulturmedien**

Als Kulturmedium wurde DMEM/Ham's F12-Lösung (DMEM/Ham's F12, Gibco) mit Zusätzen von 2 % HEPES, 10% fetalem Kälberserum (FCS, Gibco Laboratories, Karlsruhe), und 10 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor EGF (Epidermal Growth Factor, Calbiochem, La Jolla, CA) verwandt.

### **2.1.1.7 Herstellung der zweidimensionalen Extrazellulärmatrixbeschichtung**

Um den Einfluß der extrazellulären Matrix auf humane Hepatozyten zu bestimmen, wurden die verwendeten Kulturflaschen vor der Zellaussaat mit verschiedenen Matrixkomponenten beschichtet. Verwendete Matrices waren Kollagen G (Seromed, Berlin), Matrigel (Extracellular Matrix Membrane, Harbor Bio-Products, MA, USA), Fibronectin (Human Extracellular Matrix, Collaborative Biomedical Products, MA, USA) und Laminin (Mouse Laminin, Harbor Bio-Products, MA, USA). Matrigel setzte sich dabei aus Laminin, Collagen IV und Heparansulfat im Massenverhältnis 1:0,6:0,03 zusammen. Die Matrixkomponenten wurden nach Herstellerangaben mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  als Stammlösungen angesetzt und bis zum Verbrauch bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren. Lediglich Kollagen G konnte in konzentrierter Form bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt werden. 1 h vor Gebrauch wurden die Stammlösungen aufgetaut und mit PBS zur gewünschten Endkonzentration verdünnt (s. Tab. 2). Die Lösungen wurden dann in die

Kulturflaschen (Becton Dickinson) pipettiert und dort 30 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit setzten sich die Matrixkomponenten am Boden der Kulturflaschen ab. Nach Abschluß der Inkubationszeit wurden die Kulturflaschen zwei Mal mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen. Im Anschluß daran wurden die gewonnenen Zellen in den angegebenen Konzentrationen in die Kulturflaschen ausgesät.

Tab. 2

<i>Name</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Verdünnung Stammlö- sung [mg/ml]</i>	<i>Verdünnung [mg/ml]</i>	<i>Protein/ Fläche [µg/cm<sup>2</sup>]</i>
Kollagen G	Kalbshaut	3	0,5	25
Matrigel	Engelbreth-Holm-Swarm Tumor	1	0,1	5
Fibronectin	Humanes Plasma	1 (lyophili- siert)	0,1	5
Laminin	Engelbreth-Holm-Swarm Tumor	2,2	0,1	5

### 2.1.1.8 Herstellung der im Überstand gelösten Matrixfaktoren

Bei einem Teil der Versuche wurden Komponenten der extrazellulären Matrix als Zusätze zum Kulturmedium verwandt. Die Matrixkomponenten wurden dabei aus den Stammlösungen bis auf 0 °C aufgetaut und in löslicher Form dem Kulturmedium so zugefügt, daß die gewünschte Konzentration erreicht wurde (vgl. Tabelle 3).

Tab. 3

<i>Name</i>	<i>Verdünnung [mg/ml]</i>
Kollagen G	0,1
Matrigel	0,02
Fibronectin	0,02

<i>Name</i>	<i>Verdünnung [mg/ml]</i>
Laminin	0,02

Dabei wurden sowohl Kollagen G wie auch Matrigel, Fibronectin und Laminin als Bodenbeschichtung und im Kulturmedium verwandt. Es wurden dabei folgende Kombinationen der extrazellulären Matrix untersucht:

Tab. 4

<i>Extrazellulärmatrix als Bodenbeschichtung</i>	<i>Extrazellulärmatrix im Überstand</i>
Kollagen G	Matrigel
Matrigel	Kollagen G
Fibronectin	Laminin
Laminin	Fibronectin

## 2.2 Fluoreszenzanalytische Untersuchungen

Untersuchungen zu Veränderungen der intrazellulären Zytokeratine 7,8,18,19 und Vimentin, membranständiger Adhäsionsrezeptoren der Integrin-Klasse sowie der Moleküle »Major Histocompatibility Complex« I und II (MHC-I und II) und »Intercellular Adhesion Molecule I« (ICAM-I) wurden mittels Durchflußzytometrie oder konfokaler LaserScan-Mikroskopie durchgeführt.

### 2.2.1 Durchflußzytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS)

Als Meßgerät diente ein FACScan Durchflußzytometer (Becton Dickinson, Heidelberg). Hepatozyten wurden an den Versuchstagen 0, 1, 5, 10, 20, 30 untersucht. Dabei wurden die Zellen vom Versuchstag 0, dem Tag der Isolation, in Suspension nach der unten beschriebenen

Methode mit Formalin fixiert. Die Hepatozyten für die Versuchstage 1, 5, 10, 20, 30 wurden wie beschrieben in Zellkulturflaschen ausgesät und an den jeweiligen Versuchstagen zwei Mal mit PBS ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  gewaschen und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Trypsin/EDTA (Trypsin 0,05% (m/v)/EDTA 0,02 % (m/v), PAN Systems GmbH, Aidenbach) 30 Sekunden inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden danach in 10 ml PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  resuspendiert und bei 28 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet für 5 min in 5 ml 0,5% Formaldehyd-Lösung resuspendiert, um es zu fixieren. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 28 g.

### 2.2.1.1 Durchflußzytometrischer Nachweis intrazellulärer Zytokera-tine

Die Anzahl der Zellen in der Zellsuspension (vgl. 2.2.1) wurde wie in 2.1.1.3 beschrieben ausgezählt und die je nach Herstellerangaben erforderliche Antikörpermenge respektive Verdünnung bestimmt (s. Tabelle 5). Die Zellen wurden dann in Standard-Durchflußzytometrieröhrchen (Greiner Labortechnik, Solingen) überführt. Nach Zentrifugation bei 28 g wurden die Hepatozyten mit 100 $\mu\text{l}$  Permeabilisierungslösung (Fix & Perm, An der Grub Bio Research GmbH, Kaumberg, Österreich) für 5 min inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff mit Spülpuffer (0,5 % (m/v) Rinder-Serumalbumin [Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim] in PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ). Nach der Zentrifugation und Dekantieren des Überstands wurden 10 $\mu\text{l}$  der Primärantikörperlösung für 30 min zum Pellet zugegeben. Nach zweimaligem Waschen mit Spülpuffer und Zentrifugation bei 28 g wurden 10  $\mu\text{l}$  des Sekundärantikörpers für 30 min zugefügt. Danach wurde die Zellsuspension zwei Mal mit Spülpuffer gewaschen und jeweils bei 28 g zentrifugiert. Zuletzt wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und mittels des FACScan-Durchflußzytometers analysiert. Gemessen wurden dabei 10.000 Zellen in einer zuvor bestimmten Region.

Tab. 5

<i>Monoklonaler Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Klon</i>	<i>Verdünnung + Menge</i>
Anti-Cytokeratin 7	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	RCK 105	1:10; 10 $\mu\text{l}$ /10 <sup>6</sup> Zellen

<i>Monoklonaler Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Klon</i>	<i>Verdünnung + Menge</i>
Anti-Cytokeratin 8	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	Ks 8.7	1:1; 10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Anti-Cytokeratin 18	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	Ks 18.04	1:5; 10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Anti-Cytokeratin 19	Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg	Ks 19.1	1:1; 10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Anti-Vimentin	Camon Service GmbH, Wiesbaden	V9	1:1; 10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Sekundär-Antikörper	Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL	Polyklonaler FITC-markierter Sekundärantikörper	1:20; 10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen

### 2.2.1.2 Nachweis von Integrinen mittels Durchflußzytometrie

Nach Vorbereitung der Zellen (s.a. 2.2.1) wurden die Zellen ausgezählt und die nach Herstellerangaben notwendige Antikörpermenge bestimmt (siehe Tabelle 6). Die Zellen wurden in Standard-Durchflußzytometrierröhrchen überführt. Sie wurden sodann bei 28 g zentrifugiert und in Spülpuffer resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 28 g wurden sie mit dem Primärantikörper versetzt, dieser wirkte 30 min ein. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit Spülpuffer gewaschen und jeweils bei 28 g zentrifugiert. 10 µl Sekundärantikörper wurden hinzugefügt und wirkten 30 min ein. Im Anschluß an die Einwirkzeit wurde zwei Mal mit Spülpuffer gewaschen und jeweils bei 28 g zentrifugiert. Zum Schluß wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

Tab. 6

<i>Monoklonaler Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Klon</i>	<i>Verdünnung + Menge</i>
Anti-CD 49 a	Coulter Immunotech	HP2B6	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Anti-CD 49 b	Cymbus Biotechnology	CBL 477	10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Anti-CD 49 c	Coulter Immunotech	C3(VLA3)	20 µl/10 <sup>6</sup> Zellen

<i>Monoklonaler Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Klon</i>	<i>Verdünnung + Menge</i>
FITC-markiertes Anti-CD 49 e	Cymbus Biotechnology	CBL 458	10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
FITC-markiertes Anti-CD 49 f	Cymbus Biotechnology	CBL 458	10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
FITC-markiertes Anti-MHC-I	Cymbus Biotechnology	CBL 139	10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
FITC-markiertes Anti-MHC-II	Cymbus Biotechnology	CBL 120	10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Anti-ICAM	R&D Systems	BBIg-11	10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen
Sekundär-Antikörper	Southern Biotechnology Associates, Inc, Birmingham, AL	Polyklonaler FITC-markierter Sekundärantikörper	1:20; 10 µl/10 <sup>6</sup> Zellen

## 2.3 Western Blot

Zusätzlich zu den fluoreszenzanalytischen Untersuchungen wurden die Zytoskelett-Proteine Zytokeratin 7,8,18 und 19 mittels Western Blot nachgewiesen. Mit dieser Methode können Proteine elektrophoretisch mittels eines Polyacrylamid-Geles (Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese =PAGE) nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden.

Die Zellen wurden dabei von ihren Unterlagen abgelöst und lysiert. Sodann wurde eine Bestimmung des Gesamtproteins durchgeführt, um jeweils Mengen von 10 µg Protein zu bestimmen und elektrophoretisch aufzutrennen. Die aufgetrennten Proben wurden aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort mit spezifischen Antikörpern gegen die einzelnen Proteine Zytokeratin 7,8,18 und 19 nachgewiesen.

### 2.3.1 Zellablösung

Die Zellkulturen wurden an den Versuchstagen 1, 5, 10, 20, 30 jeweils mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>

gewaschen, mit 0,5% Trypsin/EDTA von der Beschichtung abgelöst und mit PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  zweimal gewaschen. Die erhaltene Zellsuspension wurde gezählt und je  $10^6$  Zellen für eine Probe verwandt. Nach Abzentrifugation der Proben bei 28 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet eingefroren.

### 2.3.2 Lysierung und Proteinbestimmung

Zur Verarbeitung der Proteinproben mussten die Zellen lysiert werden. Dies wurde bewerkstelligt, indem die Proben mit 250  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer versetzt und 5 min auf- und abpipettiert wurden. Danach wurde die Proteinlösung zur Denaturierung der DNA für 5 min bei  $95\text{ }^\circ\text{C}$  erhitzt. Nach Wiederabkühlung konnte dann die Proteinbestimmung und Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt werden.

#### Laemmli-Puffer:

757 mg Tris (Amersham, Cleveland, OH)

2% (v/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS) (United States Biochemical, Cleveland, OH)

aqua dest ad 100 ml

pH 6,8

Die Proteinbestimmung wurde modifiziert nach Lowry durchgeführt.

Bei dieser Methode bildet sich im alkalischen Bereich ein Kupfer-Proteinat-Komplex, der in einer zweiten Reaktion eine Phosphomolybdat-Phosphowolframat-Lösung (Folin-Ciocalteu'sches Reagenz) reduziert. Dabei tritt eine intensiv blaue Farbe auf, die bei 578 nm photometrisch gemessen wird.

Die Proteinproben wurden dabei gegen eine Proteinstandard-Reihe verglichen.

#### Reagenzien:

##### Lösung 1:

100 Teile 2% (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

1 Teil 1% (w/v)  $\text{CuSO}_4$

1 Teil 2% (w/v) Kalium-Natrium-Tartrat

Lösung 2:

50% Folin-Ciocalteu'sches Reagenz

Lösung 3:

1N NaOH

Lösung 4:

0,1% (w/v) BSA in SDS-Lysepuffer

Lösung 5 (SDS-Lysepuffer):

62,5 mM Tris

2% SDS

pH 6,8

Zunächst wurde eine Protein-Standardreihe mit BSA hergestellt. Die Proteinkonzentrationen betragen dabei zwischen 0 und 1000  $\mu\text{g/ml}$ , die 0,1% BSA-Lösung (Lösung 4) wurde mit SDS-Lysepuffer (Lösung 5) verdünnt.

Proteinkonzentration[ $\mu\text{g/ml}$ ]	0	200	400	600	800	1000
$\mu\text{l}$ 0,1% BSA-Lösung	0	20	40	60	80	100
$\mu\text{l}$ SDS-Lysepuffer	100	80	60	40	20	0

Protein-Proben und Protein-Standardreihe wurden parallel weiterverarbeitet. Je 50  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung wurden mit 50  $\mu\text{l}$  1N NaOH ergänzt. Dann wurde je 1 ml Lösung 1 hinzugegeben und 30 min inkubiert. Danach wurden 100  $\mu\text{l}$  Lösung 2 hinzugegeben und noch einmal 60 min inkubiert. Sodann wurde das Photometer bei 578 nm gegen den Leerwert (Protein-Standardreihe, 0  $\mu\text{g/ml}$  Protein) abgeglichen und die Extinktionen der Protein-Proben gemessen. Aus den Konzentrationen und Extinktionen der Proteinstandardreihe konnte eine Regressionsgerade ermittelt werden, anhand derer auf die Proteinkonzentrationen in den Protein-Proben geschlossen werden konnte.

Die für die Polyacrylamidgelelektrophorese bestimmten 200  $\mu\text{l}$  Proteinprobe wurden mit 30  $\mu\text{l}$  Laemmli-II-Puffer (einem Gemisch aus 66 % (v/v) Glycerol, 33 % (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,6 % (v/v) Bromphenolblau) im Verhältnis 6,6:1 verdünnt, so daß in der endgültigen Pro-

teinprobe 10% (v/v) Glycerol, 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol und 0,01% (v/v) Bromphenolblau enthalten waren.

### 2.3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde modifiziert nach der Methode von Laemmli durchgeführt.

Bei dieser Methode werden Proteine durch das anionische Detergens SDS negativ geladen. Im Polyacrylamidgel werden die Proteine dadurch nicht mehr nach ihrer Ladung, sondern nur noch nach ihrer Größe und damit nach ihrer Molekülmasse getrennt.

Das Polyacrylamidgel verbindet zwei mit Elektrophoresepuffer gefüllte Kammern. An diese Kammern wird eine Gleichspannung zwischen 60 und 100 V angelegt, so daß die aufzutrennenden Proteine in Richtung auf die Anode zu im Gel wandern. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine durch ihre Größe und den Vernetzungsgrad des Polyacrylamid-Polymers bestimmt, so daß kleine Proteine eine höhere Wanderungsgeschwindigkeiten aufweisen als große Proteine.

Um eine gleichmäßige Auftrennung zu gewährleisten, wurde die Proteinlösung erst in einem 4% Sammelgel konzentriert, das nahtlos in das 10% Trenngel überging. Diese wurden wie folgt angesetzt:

#### Trenngel 10%, geeignet zur Auftrennung von Proteinen zwischen 15-60 kDa

2,6 ml Aqua destillata

100 µl 10% SDS

2,5 ml Trenngelpuffer

3,2 ml Acrylamid A (rotiphorese A, Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe)

1,6 ml Bisacrylamid B (rotiphorese B, Carl Roth GmbH+Co)

100 µl 10% APDS (Ammoniumperoxodisulfat, Carl Roth GmbH+Co)

10 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Carl Roth GmbH+Co)

Trenngelpuffer:

13,62 g Tris  
aqua dest. ad 100 ml  
pH 8,8 (1 N HCl)

Sammelgel 4%

5,4 ml Aqua destillata  
100 µl 10% SDS  
2,5 ml Sammelgelpuffer  
1,3 ml Acrylamid A  
0,6 ml Bisacrylamid B  
100 µl 10% APDS  
10 µl TEMED

Sammelgelpuffer:

13,62 g Tris  
aqua dest. ad 100 ml  
pH 6,8 (1 N HCl)

Elektrophoresepuffer:

3 g Tris  
14,4 g Glycin (AppliChem, Darmstadt)  
1 g Natrium-Dodecylsulfat (United States Biochemical)  
aqua dest. ad 1 l

Zur PAGE wurde die Apparatur Mini-Protean II (BioRad, Hercules, CA) verwandt. Dazu wurden 2 Glasplatten in einer Gießapparatur mit zwei Trennelementen 1 mm auseinandergehalten und ca 3,3 ml der Lösung für das Trenngel eingefüllt, so daß sich ein Gel der ungefähren Größe 10 x 3 cm<sup>2</sup> bildete. Das noch flüssige Gel wurde mit 200 µl Isobutanol überschichtet, um eine ebene Grenzfläche zu erzeugen. Nach 10 min war das Gel so weit ausgehärtet, daß das Isobutanol abgegossen und mit destilliertem Wasser nachgespült werden konnte. Mit Filterpapieren wurden Flüssigkeitsreste auf dem Trenngel entfernt und 1,5 ml der Sammelgellösung über das Trenngel überschichtet. Die Probestaschen wurden mittels eines kleinen Kammes, der in die noch flüssige Sammelgellösung eingebracht wurde, erzeugt. Auch

dieses Gel härtete 10 min aus und wurde mit destilliertem Wasser gespült und wieder getrocknet, bevor die Proben aufgetragen werden konnten. (Abb. 2)

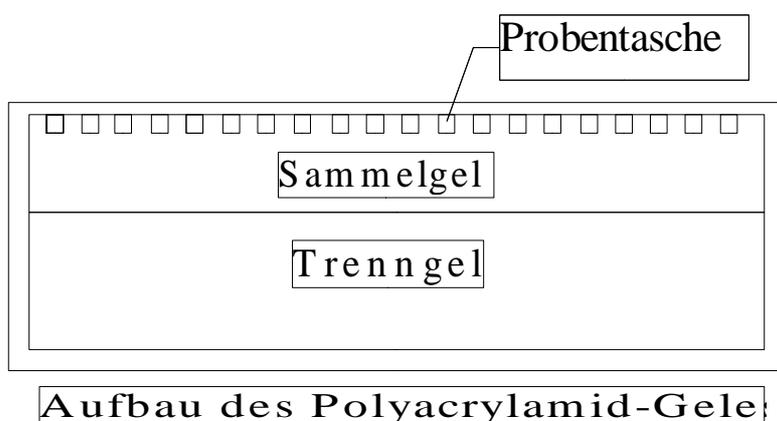


Abbildung 2

Nach dem Gießen des Geles, dem Umsetzen der Gele in die Elektrophoreseapparatur sowie der Befüllung mit Elektrophorese-Puffer wurden in jede Probentasche 10 µg Protein aufgetragen und die Elektrophorese bei 60 V gestartet. Nach 15 min war die Proteinprobe jeweils vollständig durch das Sammelgel gewandert und befand sich schon im Trenngel, so daß die Spannung auf 100 V erhöht werden konnte. Nach durchschnittlich 1 h war die Auftrennung der Proteine so weit fortgeschritten, daß die Elektrophorese beendet werden konnte. Zur Identifizierung der entstandenen Banden wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Katalog-Nummer B2787, Sigma-Aldrich, München).

### 2.3.4 Western Blot

Um die Proteine mittels Antikörpern nachweisen zu können, mußten sie aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden. Dabei wurde nach der modifizierten Methode von Towbin gearbeitet.

Bei dieser Methode wird das Gel in einer Elektrophoresekammer in engen Kontakt mit der Nitrozellulosemembran gebracht und die Proteine anschließend per Elektrophorese aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Für den Western Blot wurden Schwämme und Schwamm-papiere mit Transferpuffer befeuchtet.

Dann wurden sie luftblasenfrei mit Gel und Nitrozellulosemembran wie dargestellt in der Transferkammer angeordnet. Der 1 h dauernde Blot-Vorgang wurde gestartet, er lief bei einer Spannung von 100 V ab. (Abb. 3)

Transferpuffer:

3 g Tris

14,4 g Glycin

200 ml Methanol (Riedel de Haën, Seelze)

aqua dest. ad 1 l

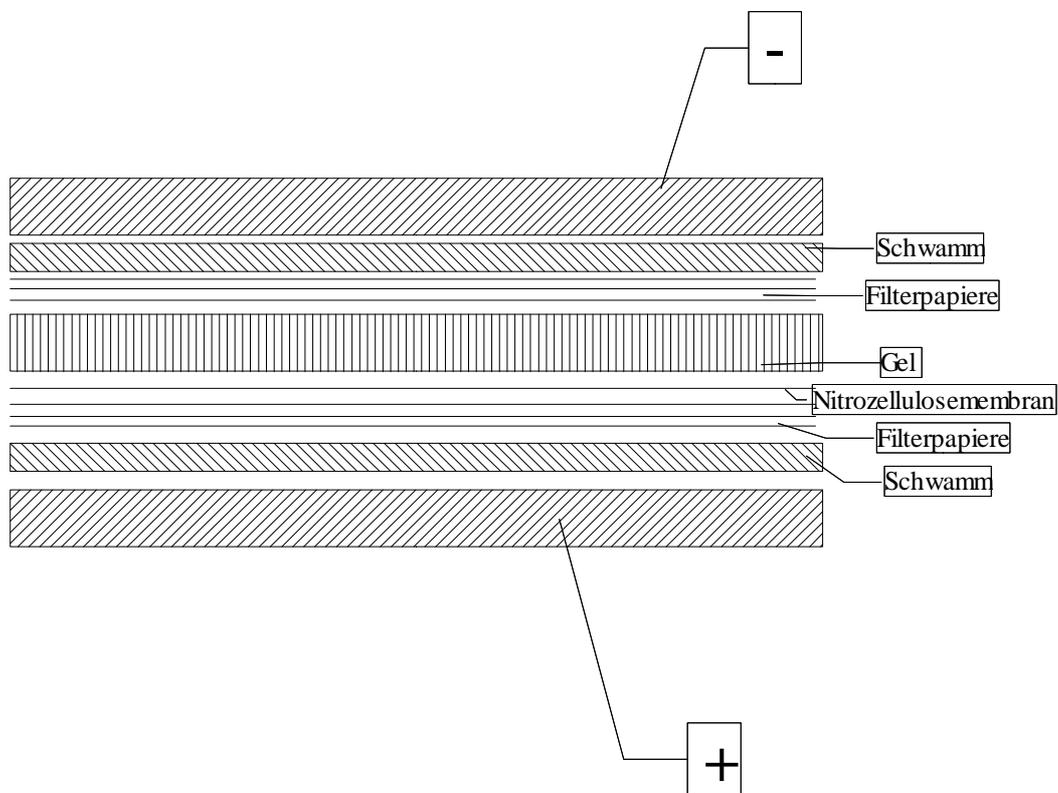


Abbildung 3

### 2.3.5 Färbung der Nitrozellulosemembran

Der Nachweis der Zytokeratine erfolgte mit Hilfe monoklonaler Primärantikörper und dem ABC (Avidin-Biotin-Complex)-Färbekit der Firma Vectastain. Dabei bindet ein sekundärer biotinylierter Antikörper den Primärantikörper. Zum Nachweis dieses Antikörpers wird ein Komplex aus Avidin und Biotin-gekoppelter alkalischer Phosphatase hinzugegeben. Avidin, ein kleines Eiweiß mit 4 Bindungsstellen für Biotin, bildet dabei mit verschiedenen Molekülen alkalischer Phosphatase einen Komplex. Dieser wird über die Biotinmoleküle an den sekundären Antikörper gebunden, so daß mehrere Moleküle alkalische Phosphatase an ein Molekül des sekundären Antikörpers gebunden ist. (Abb. 4)

Die Färbung umfaßte folgende Schritte:

- 1) Spülung der Nitrozellulosemembran (NZM) für 5 min in Towbin-Puffer
- 2) Spülung der NZM für 60 min in Blockierlösung
- 3) Zweimalige fünfminütige Spülung der NZM in Towbin-Puffer
- 4) Sechzigminütige Inkubation der NZM in Primärantikörper, der Primärantikörper wurde dabei 1:5000 verdünnt
- 5) Dreimalige Spülung der NZM in Blotpuffer für jeweils 10 min
- 6) Dreißigminütige Inkubation der NZM mit sekundärem Antikörper, der 1:5000 verdünnt wurde
- 7) Dreimalige Spülung der NZM in Blotpuffer für jeweils 10 min
- 8) Inkubation der NZM in ABC-Lösung für 30 min
- 9) Zweimalige Spülung der NZM in Blotpuffer für jeweils 10 min
- 10) Inkubation der NZM in Entwicklungspuffer für 10 min
- 11) Inkubation der NZM in Färbelösung bei Verdunkelung, die Färbung wurde beendet, sobald eine Bande deutlich hervortrat.
- 12) Spülung der NZM aqua destillata

Die Ergebnisse wurden per Scanner dokumentiert.

#### Towbin-Puffer:

1,21 g Tris

9 g NaCl (AppliChem)  
aqua dest ad 1 l  
pH 7,4 (1 N Salzsäure)

Blockierlösung:

Towbin-Puffer  
10% (w/v) Magermilchpulver

Blot-Puffer:

Towbin-Puffer  
0,5% (v/v) Tween 20

Antikörper-Puffer:

Blot-Puffer  
0,5% (w/v) Rinder-Serumalbumin

AP-Lösungspuffer:

Blot-Puffer  
0,1% (w/v) Rinder-Serumalbumin

ABC-Lösung:

je 2 Tropfen Kit-Lösung A (Avidin) und B (Biotin) zu 50 ml AP-Lösungspuffer

Entwicklungspuffer:

6 g Tris  
2,98 g NaCl  
0,51 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
aqua dest. ad 400 ml  
pH ad 9,5 (1 N HCl)  
dann auffüllen mit aqua dest ad 500 ml

Färbelösung:

30 ml Entwicklungspuffer  
200 µl Nitroblautetrazolium (NBT)

100  $\mu$ l 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz (BCIP)

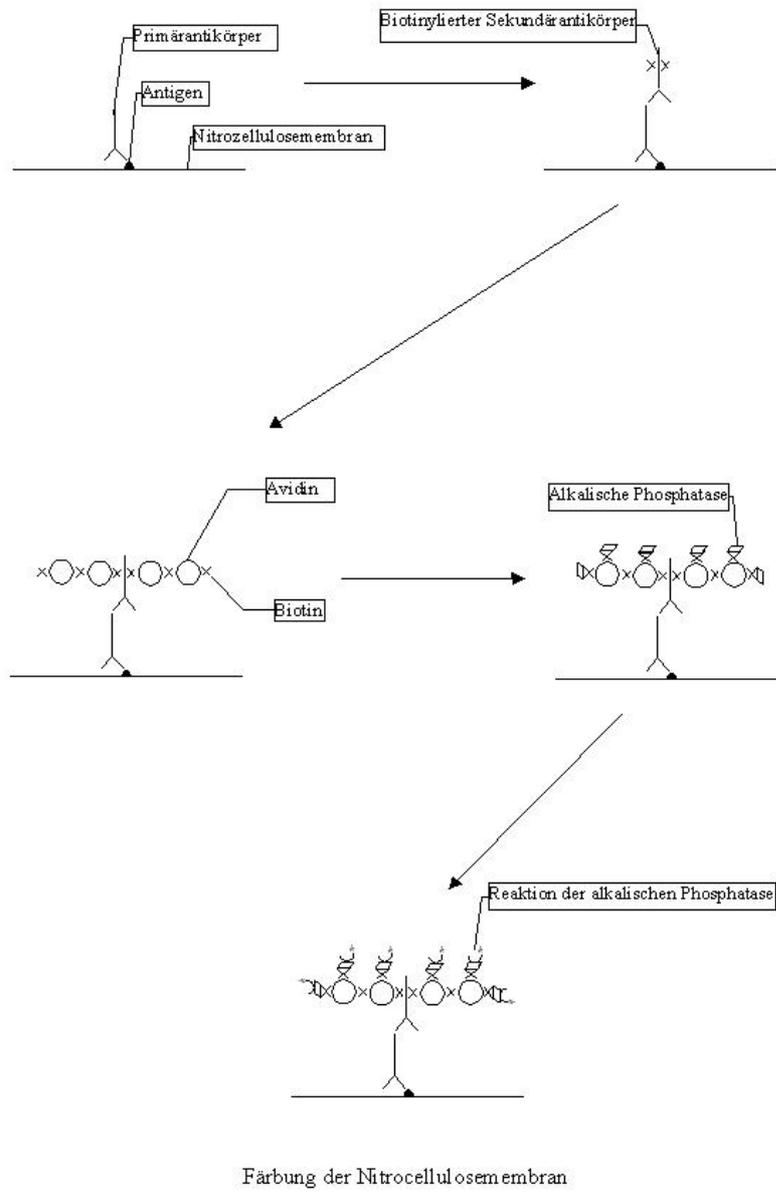


Abbildung 4

### 2.3.6 Lösungen und Puffer

Folgende Lösungen und Puffer wurden verwandt:

1) Laemmli-Puffer:

757 mg Tris (Amersham, Cleveland, OH) (entsprechend 62,5 mMol) + 2% (v/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS) (United States Biochemical, Cleveland, OH) wurden mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Der pH wurde auf 6,8 adjustiert.

2) Trenngelpuffer:

13,62 g Tris (Amersham) (entsprechend 1,125 Mol) wurden mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und der pH auf 8,8 eingestellt.

3) Sammelgelpuffer:

13,62 g Tris (Amersham) (entsprechend 1,125 Mol) wurden mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt und der pH auf 6,8 eingestellt.

4) Elektrophoresepuffer:

3 g Tris (Amersham) (entsprechend 250 mMol), 14,4 g Glycin (entspricht 192 mMol) und 1 g Natrium-Dodecylsulfat (United States Biochemical) werden mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

5) Transferpuffer:

3g Tris (Amersham) (entspricht 250 mMol), 14,4 g Glycin (AppliChem, Darmstadt) (entspricht 192 mMol) und 200 ml Methanol (Riedel-deHaën, Seelze) werden mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

6) Towbin-Puffer:

1,21 g Tris (Amersham) (entspricht 10 mMol) und 9 g NaCl (AppliChem) (entspricht 153 mMol) werden mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt, der pH mit 1 N Salzsäure auf 7,4 eingestellt.

7) Blockierlösung:

Towbin-Puffer + 10% (w/v) Magermilchpulver

8) Blot-Puffer:

Towbin-Puffer + 0,5 % (v/v) Tween 20

9) Antikörper-Puffer:

Blotpuffer + 0,5% (w/v) Rinder-Serumalbumin

10) AP-Lösungspuffer:

Blotpuffer + 0,1% (w/v) Rinder-Serumalbumin

11) ABC-Lösung (aus dem Färbekit der Fa. Vectastain)

12) Entwicklungspuffer:

6 g Tris (entspricht 500 mMol), 2,98 g NaCl (entspricht 50 mMol) und 0,51 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (entspricht 5 mMol) werden mit 400 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Der pH wird auf 9,5 adjustiert und die Lösung dann mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt.

13) Färbelösung:

Zu 30 ml Entwicklungspuffer werden 200  $\mu\text{l}$  Nitroblautetrazolium (NBT) und 100  $\mu\text{l}$  5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat-p-toluidinsalz (BCIP) gegeben.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Charakterisierung der Zellen nach Isolation**

#### **3.1.1 Charakterisierung der isolierten Zellen anhand des Zellskeletts**

Hepatozyten sind als epitheliale Zellen der Leber durch das Vorhandensein von Zytokeratinen und die Abwesenheit von Vimentin und Desmin gekennzeichnet. Im Unterschied zu Gallengangsepithelien exprimieren Hepatozyten dabei die Zytokeratine 8 und 18, während Gallengangsepithelien die Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 exprimieren.

In durchgeführten Bestimmungen zur Ermittlung der Zellreinheit nach Isolation kamen die Zytokeratine 8 und 18 zur Darstellung, die Meßwerte für die Zytokeratine 7 und 19 waren unterhalb der Nachweisgrenze. Eine geringe Expression von für Fibroblasten spezifisches Vimentin war nachweisbar. (Abb. 5)

#### **3.1.2 Charakterisierung der isolierten Zellen anhand des Integrinmusters**

Physiologischerweise werden auf Hepatozyten die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  exprimiert, Gallengangsepithelien exprimieren hingegen die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$ . Durchflußzytometrische Untersuchungen direkt nach Zellisolation ergaben den Nachweis von Integrin  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$ . Die Meßwerte für die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  lagen unterhalb der Nachweisgrenze. (Abb. 6)

### **3.1.3 Charakterisierung der isolierten Zellen anhand exprimierter immunmodulatorischer Moleküle**

Frühere Arbeiten haben gezeigt, daß Hepatozyten zur Expression von ICAM-1 und der MHC-Komplexe befähigt sind. In durchflußzytometrischen Untersuchungen konnten diese Moleküle auf den isolierten Zellen nachgewiesen werden und entsprachen dabei den bekannten Mengenverhältnissen, wonach ICAM-1 und MHC-1 relativ gut, MHC-II jedoch nur schwach exprimiert werden. (Abb. 7)

## Charakterisierung über Zytokeratine

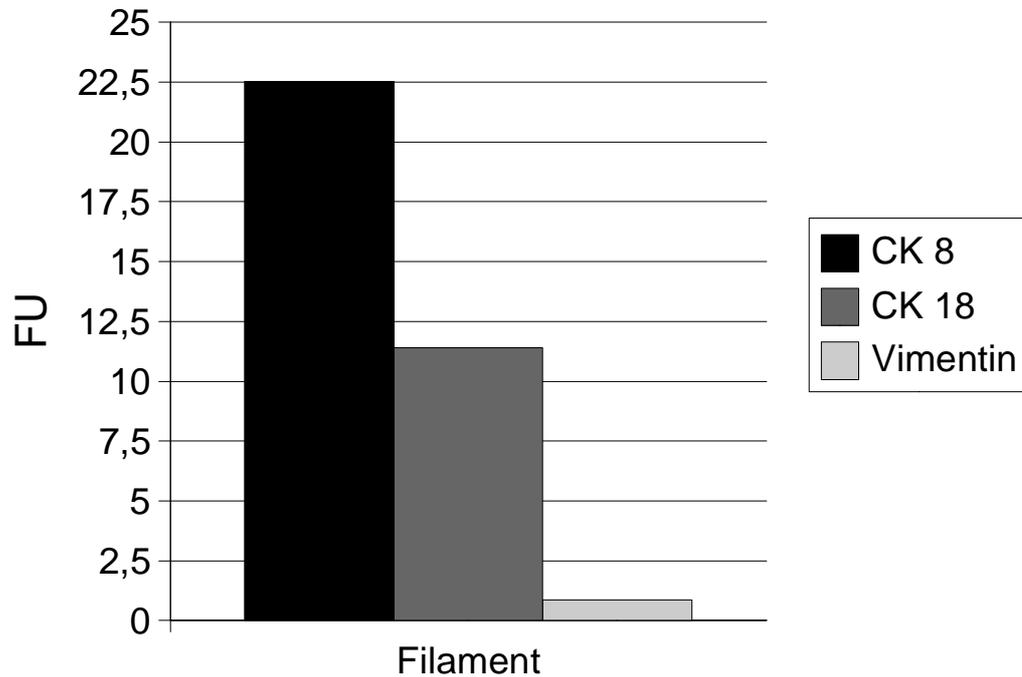


Abbildung 5: Nachweis der Zytokeratine 8 und 18 in den isolierten Zellen. Die Meßwerte für Zytokeratin 7 und 19 waren unterhalb der Nachweisgrenze. Vimentin war in geringem Maße nachweisbar. Mittlere SD=12%

## Charakterisierung über Integrine

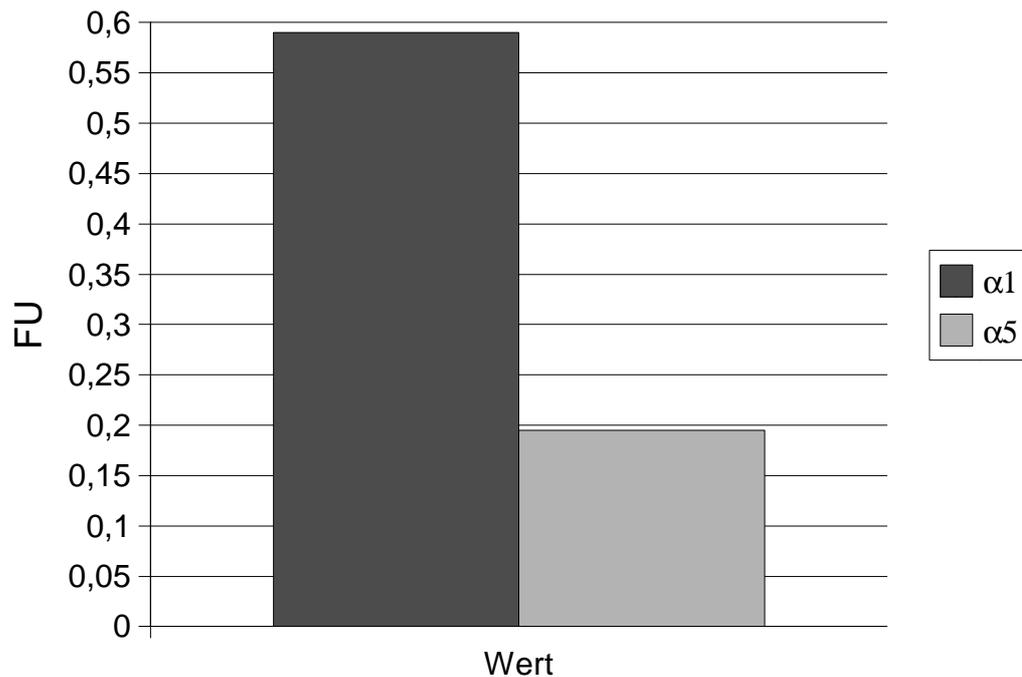


Abbildung 6: Nachweis der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  in den isolierten Zellen. Die Meßwerte für die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Mittlere SD=15%

## Charakterisierung über ICAM/MHC

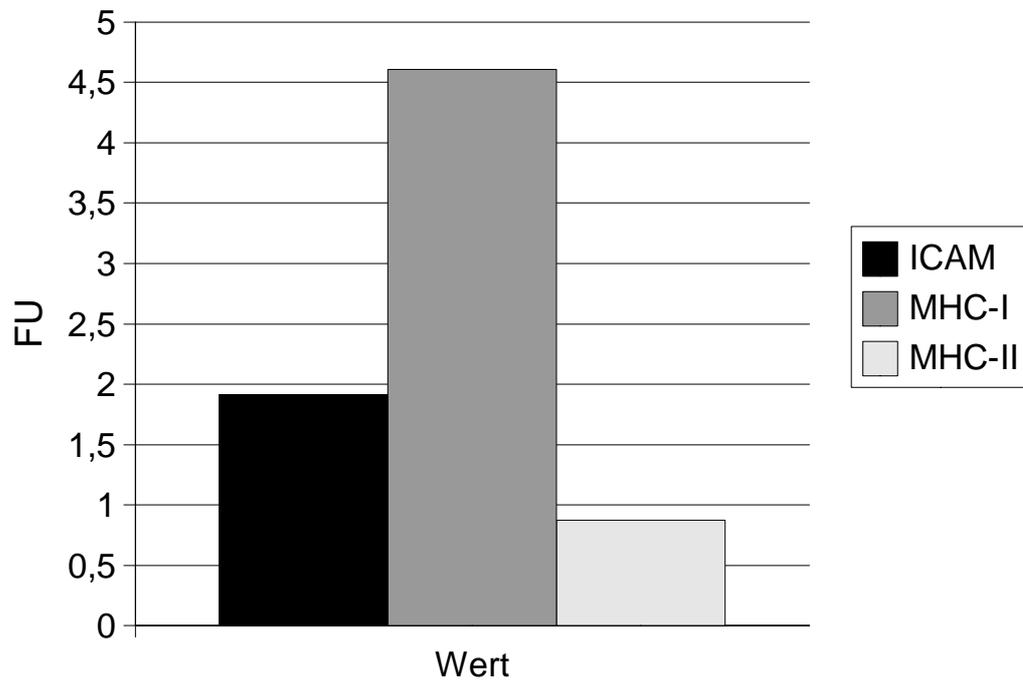


Abbildung 7: Nachweis der Oberflächenmarker ICAM-I, MHC-I und MHC-II auf den isolierten Zellen. Mittlere SD=13%

## **3.2 Zeit-Expressions-Kurven der durchflußzytometrischen Analysen der Zytokeratine**

Die zur Ermittlung des Einflusses verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten angelegten Zellkulturen wurden wie angegeben verarbeitet. Die Ergebnisse sind als Zeit-Expressions-Kurven dargestellt. Hierbei gilt für alle Zeit-Expressions-Kurven, daß Zytokeratin 7 und 19 vom beschriebenen Ausgangswert 0 ausgehen, während Zytokeratin 8 und 18 sowie Vimentin von ihrem Ausgangswert  $> 0$  ausgehen.

### **3.2.1 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix (C/0)**

Zytokeratin 7 steigt vom Ausgangswert zum ersten Versuchstag an, um dann wieder abzufallen und über die folgenden Versuchstage konstant zu bleiben. Zytokeratin 8 steigt zum ersten Versuchstag an, nimmt am 5. Versuchstag ab und stabilisiert sich über die folgenden Versuchstage. Zytokeratin 18 steigt zum ersten Versuchstag an, fällt zum 5. Versuchstag wieder ab, steigt zum 10. Versuchstag wieder an und nimmt dann kontinuierlich ab. Zytokeratin 19 steigt bis zum 20. Versuchstag mit einer kleinen Abwärtsbewegung am 5. Tag an, vom 20. zum 30. Versuchstag kommt es zu einer Abwärtsbewegung wieder auf das Ausgangsniveau. Vimentin steigt kurzzeitig bis zum 5. Versuchstag an und nimmt dann ab. (Abb. 8)

### **3.2.2 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (C/M)**

Zytokeratin 7 steigt am ersten Tag zu einem Maximum an, um dann am 5. Tag wieder abzufallen und dann bis zum 30. Versuchstag kontinuierlich anzusteigen. Zytokeratin 8 steigt ebenfalls am ersten Tag bis zu einem Maximum an, um dann wieder abzufallen und am 10. Versuchstag ein weiteres Maximum aufzuweisen. Von diesem ausgehend fallen die folgenden Meßwerte bis zum 30. Versuchstag kontinuierlich ab. Zytokeratin 18 erreicht am ersten Versuchstag ein Maximum, um dann bis zum 30. Versuchstag undulierend abzunehmen. Zytokeratin 19 weist ein von einem Minimum unterbrochenes kontinuierliches Wachstum auf. Die Vimentin-Expression steigt am ersten Versuchstag kurzzeitig an und zeigt dann eine konstante Ausprägung. Im Vergleich der Expression der Zytokeratine 8 und 18 liegen die Meßwerte hierbei um 4%

respektive 8% oberhalb der mit dem zweidimensionalen Collagen-I-Ansatz (C/0) bestimmten Ergebnisse. Zytokeratin 19 und Vimentin weisen demgegenüber erniedrigte Werte von 11% und 7% auf. Die Expression von Zytokeratin 7 steigt ab dem 10. Versuchstag an und liegt ab diesem Zeitpunkt oberhalb der Expression des zweidimensionalen Modells.(Abb. 9)

## Zytokeratin - Collagen I

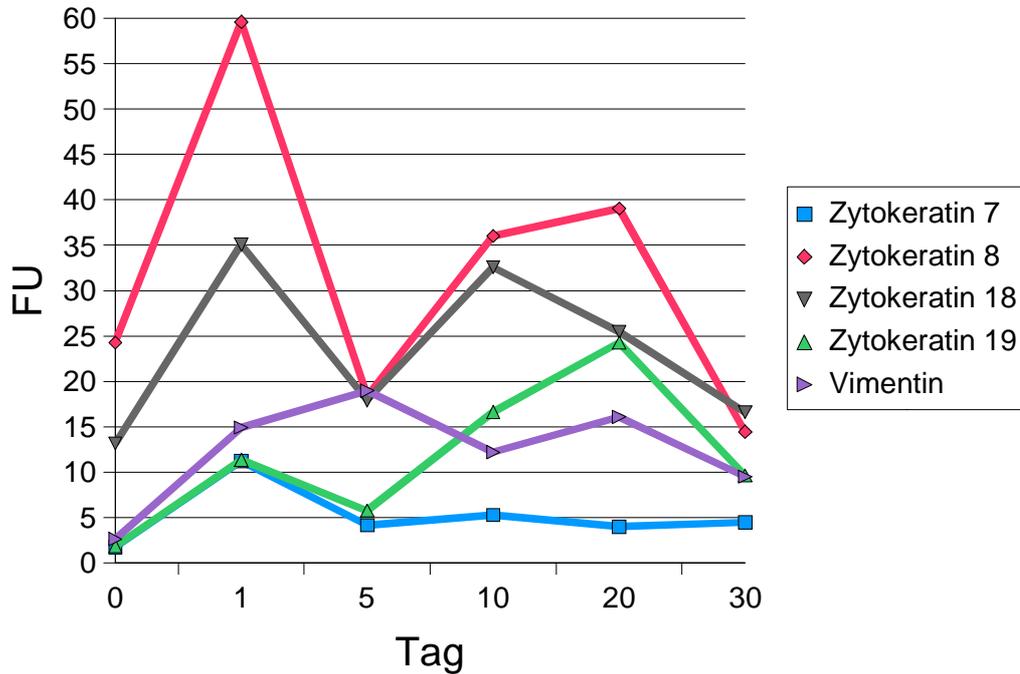


Abbildung 8: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Collagen I-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

## Zytokeratin - Collagen I + Matrigel

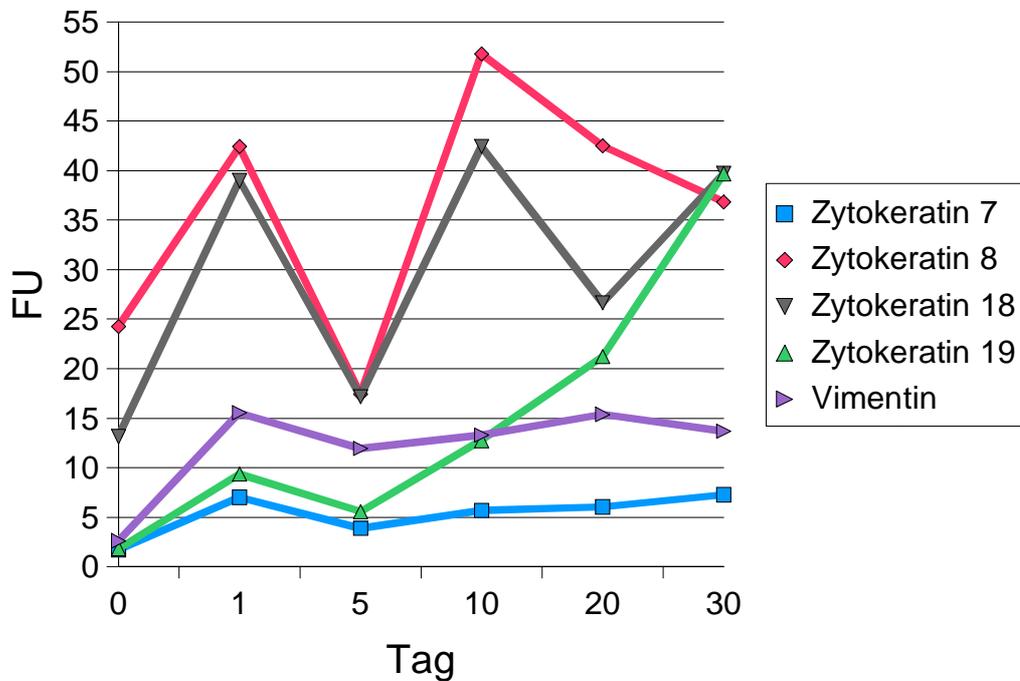


Abbildung 9: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Collagen I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Matrigel angereichert.. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=26%

### **3.2.3 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen-I angereicherten Kultur-Mediums (C/C)**

Die Expression von Zytokeratin 7 erreicht am 5. Versuchstag ihr Maximum, von diesem ausgehend zeigt sich ein protrahierter Abfall bis zum 30. Versuchstag. Zytokeratin 8 war am 10. Versuchstag maximal anfärbbar und fiel dann auf niedrige Werte ab. Die Synthese von Zytokeratin 18 zeigte am ersten Versuchstag ein Maximum, um dann kontinuierlich abzufallen. Die Expression von Zytokeratin 19 zeigte am 5. Tag ein Maximum und blieb von diesem aus relativ konstant. Die Vimentin-Expression zeigte an 5. Tag ein Maximum und begann dann langsam zu fallen.

Im Vergleich mit dem zweidimensionalen Collagen-I-Ansatz (C/O) stellt sich die Expression der Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 supprimiert dar. Vimentin wird ebenfalls vermindert exprimiert. Am stärksten ist hierbei die Expression von Vimentin um 40% vermindert, gefolgt von der Expression von Zytokeratin 8 um 38%. Die Expression von Zytokeratin 19 wurde durch Zugabe von flüssigem Collagen-I zum Kulturmedium um 21% vermindert, die Expression von Zytokeratin 18 um 13%. Zytokeratin 7 wies nahezu konstante Meßwerte auf. (Abb. 10)

### **3.2.4 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix (M/O)**

Zytokeratin 7 zeigte eine maximale Expression am ersten Versuchstag und fiel in der Folge ab. Die Expression von Zytokeratin 8 zeigte ein Maximum am ersten und 10. Versuchstag, um dann am 20. und 30. Versuchstag konstant zu bleiben. Die Meßwerte für Zytokeratin 18 zeigten einen undulierenden Anstieg bis zum 30. Versuchstag. Die Expression von Zytokeratin 19 zeigte einen kontinuierlich ansteigenden Verlauf, der durch ein Zwischenmaximum am ersten Versuchstag unterbrochen wurde. Die Synthese von Vimentin erreichte am ersten Versuchstag einen Wert, den sie bis auf ein Zwischenminimum am 10. Versuchstag beibehielt. (Abb. 11)

## Zytokeratine - Collagen I + Collagen I

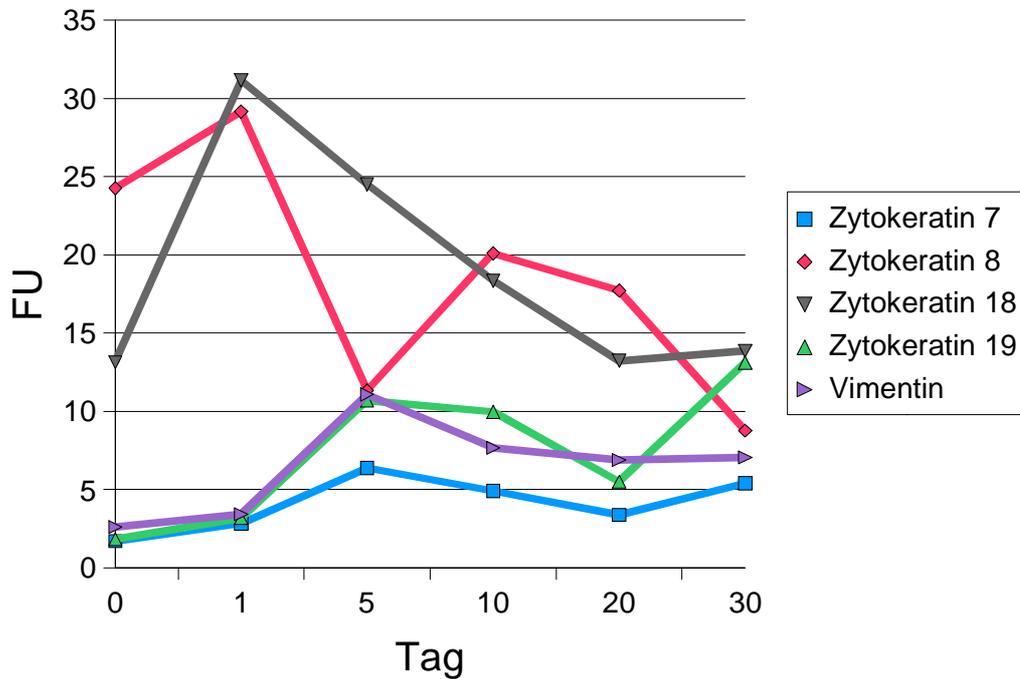


Abbildung 10: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Collagen I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Collagen-I angereichert.. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=33%

## Zytokeratine - Matrigel

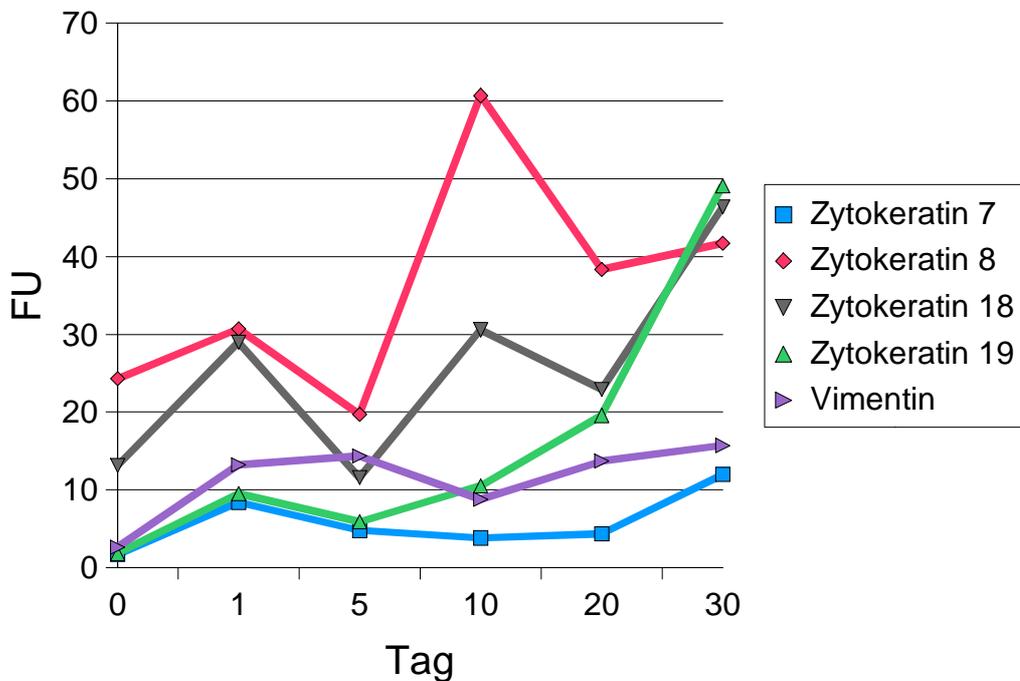


Abbildung 11: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Matrigel-Matrix. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=35%

### **3.2.5 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen-I angereicherten Kultur-Mediums (M/C)**

Zytokeratin 7 war am ersten Versuchstag maximal nachweisbar, die Expression erreichte am 5. Versuchstag ein Minimum, von dem aus sich die Meßwerte um ein mittleres Niveau einpendelten. Die Expression von Zytokeratin 8 stieg am ersten Versuchstag auf ein Maximum an, fiel daraufhin ab und blieb bis zum 10. Versuchstag supprimiert, um dann konstant auf einem Niveau zu persistieren. Die Expression von Zytokeratin 18 zeigte ein ähnliches Verhalten, im Unterschied zu Zytokerratin 8 wuchsen die Meßwerte jedoch vom 10. bis zum 30. Versuchstag kontinuierlich an. Die Synthese von Zytokeratin 19 zeigte ein Maximum am ersten Versuchstag, war dann supprimiert und zeigte erst wieder in der Spätphase am 20. und 30. Versuchstag einen Anstieg. Die Expression von Vimentin zeigte am ersten Versuchstag ein Maximum und schwankte in den späteren Versuchstagen um ein mittleres Niveau.

Im Vergleich mit dem zweidimensionalen Matrigel-Modell (M/0) wird Zytokeratin 7 in vergleichbarer Größe exprimiert. Zytokeratin 8 zeigte im Vergleich mit dem zweidimensionalen Modell eine verminderte Expression. Zytokeratin 18 hingegen wies bis zum Versuchstag 5 eine vermehrte Expression gegenüber dem zweidimensionalen Modell, ab diesem Zeitpunkt jedoch eine verminderte Expression um 25%. Zytokeratin 19 zeigte ein ähnliches Verhalten, jedoch war die Expression gegenüber dem zweidimensionalen Modell ab dem 10. Versuchstag um 50% vermindert. Vimentin wies während der Versuchszeit eine verminderte Expression um 15% auf. (Abb. 12)

### **3.2.6 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (M/M)**

Zytokeratin 7 zeigte eine wachsende Expression bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall der Meßwerte auf ein niedriges Niveau. Zytokeratin 8 wies generell eine niedrige Expression mit einem zwischenzeitlichen Maximum am 10. Versuchstag auf. Zytokeratin 18 zeigte mit einer maximalen Expression am 10. Versuchstag ein ähnliches Verhalten. Zytokeratin 19 war am 10. Versuchstag maximal exprimiert, in der Folge fielen die Meßwerte ab. Vimentin wurde nur geringgradig synthetisiert, unterbrochen jedoch von einer maximalen Synthese am 10. Versuchstag.

Verglichen mit dem zweidimensionalen Matrigel-Modell (M/0) wiesen alle Zytokeratine und Vimentin eine verminderte Expression auf. Die Meßwerte für Zytokeratin 7 waren dabei um 34% vermindert, für Zytokeratin 8 um 50%, für Zytokeratin 18 um 22%, für Zytokeratin 19 um 25% und für Vimentin um 75%. (Abb. 13)

## Zytokeratine - Matrigel + Collagen I

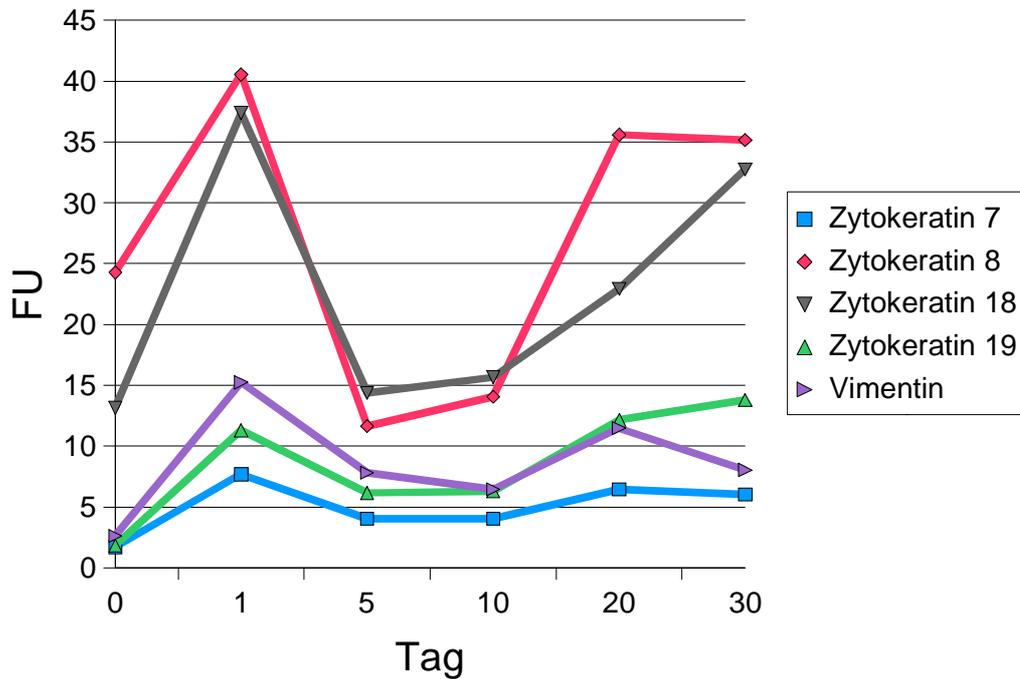


Abbildung 12: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Matrigel-Matrix. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere  $SD=33\%$

## Zytokeratine - Matrigel + Matrigel

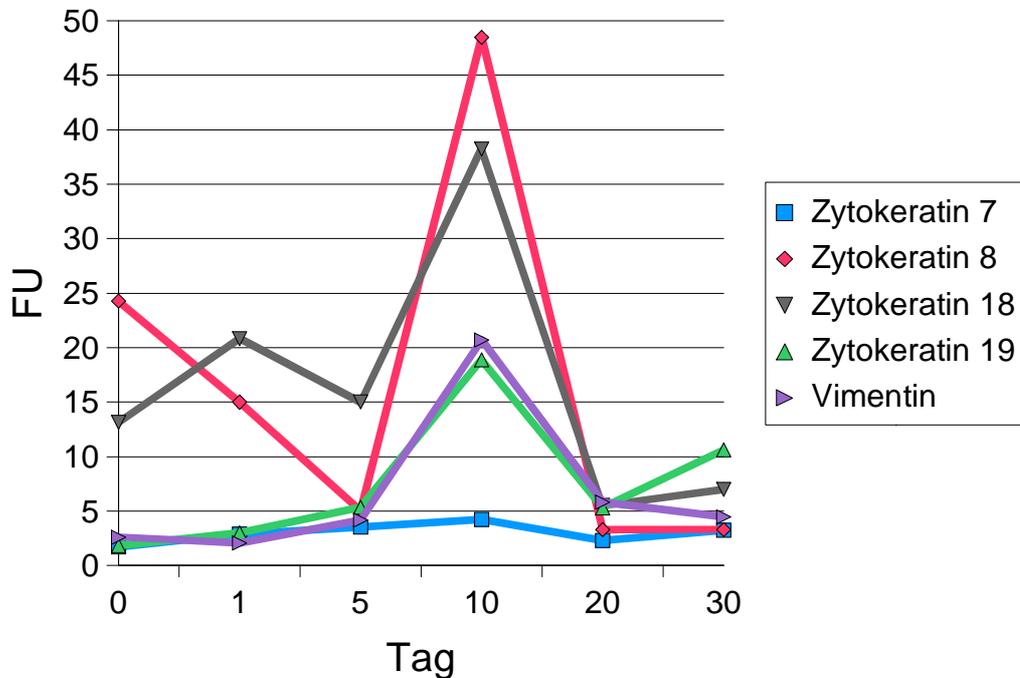


Abbildung 13: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere  $SD=28\%$

### **3.2.7 Hepatozyten auf einer Laminin-Matrix (L/0)**

Die Expression von Zytokeratin 7 zeigte einen weitgehend konstanten Verlauf vom ersten bis zum 20. Versuchstag. Zytokeratin 8 hingegen wies einen Anstieg der Proteinsynthese vom 10. bis zum 20. Versuchstag auf. Zytokeratin 18 zeigte ein Absinken der Meßwerte vom ersten bis zum 10. Versuchstag und ein Persistieren auf diesem Niveau. Zytokeratin 19 wies einen Anstieg der Synthese bis zum 20. Versuchstag und ein Absinken auf sehr niedrige Werte am Versuchstag 20 auf. Vimentin wurde am ersten Versuchstag maximal exprimiert und fiel dann auf niedrige Werte ab. (Abb. 14)

### **3.2.8 Hepatozyten auf einer Fibronectin-Matrix (F/0)**

Die Expression von Zytokeratin 7 wies ein Maximum am 10. Versuchstag auf und fiel dann wieder ab. Zytokeratin 8 hingegen zeigte eine konstante Expression bis zum 10. Versuchstag und einen starken Anstieg bis zum 20. Versuchstag. Zytokeratin 18 wies einen hohen initialen Meßwert am Versuchstag 1 auf, dieser wurde nach passagerem Absinken am 10 Tag am letzten Versuchstag wieder erreicht. Zytokeratin 19 zeigte einen Anstieg der Meßwerte bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall zum 20. Versuchstag. Vimentin zeigte eine kontinuierliche Expression während der Versuchsreihe. (Abb. 15)

## Zytokeratine - Laminin

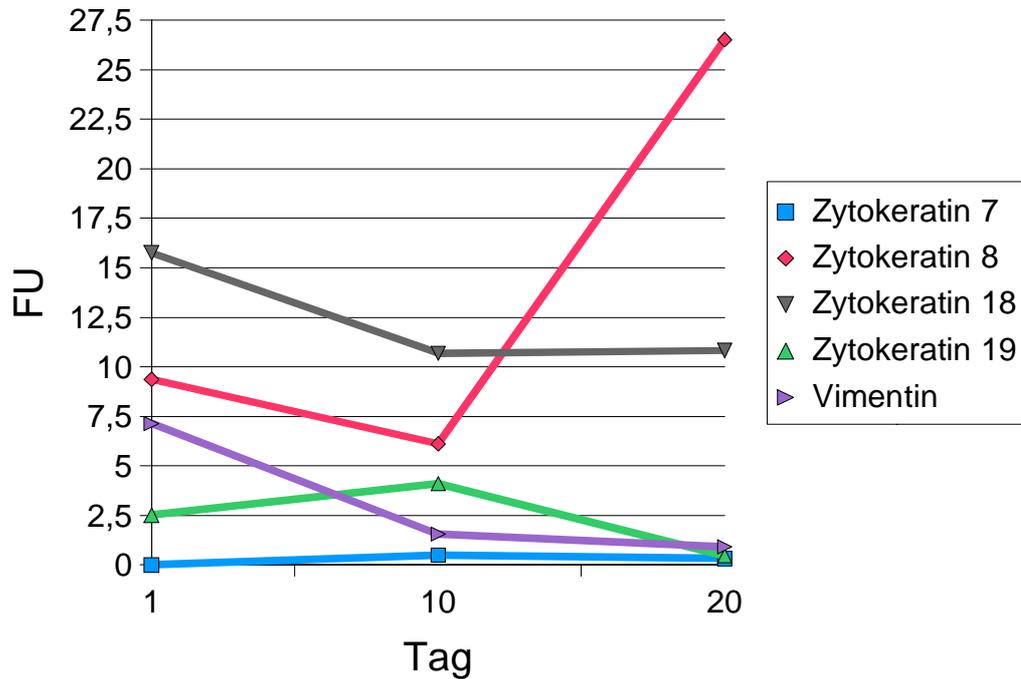


Abbildung 14: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Laminin-Matrix. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten.. Mittlere  $SD=30\%$

## Zytokeratine - Fibronectin

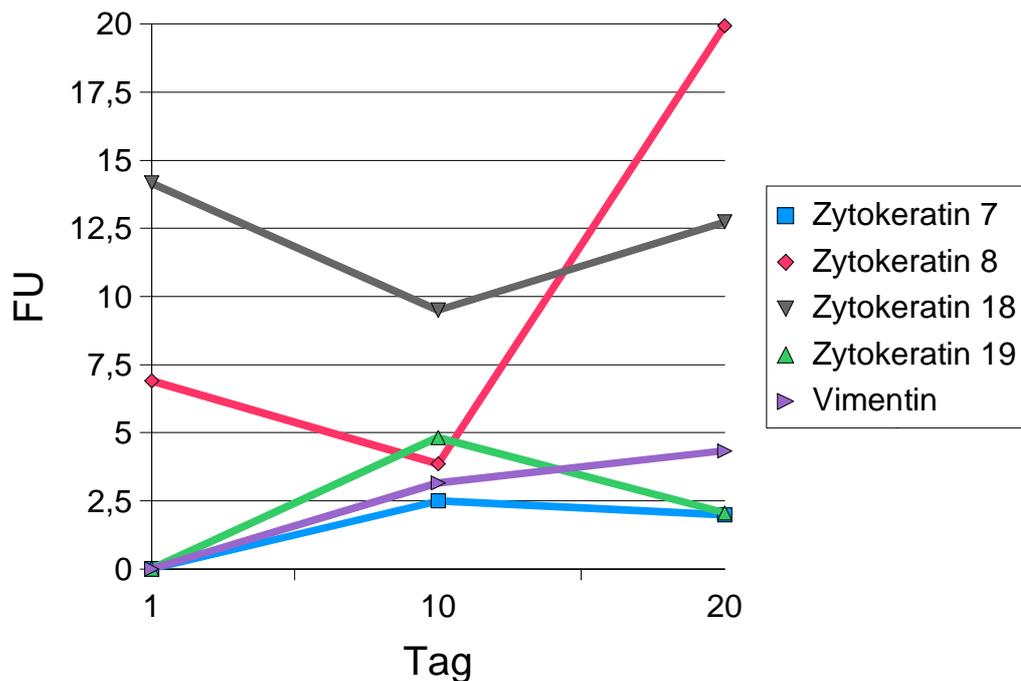


Abbildung 15: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Fibronectin-Matrix. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere  $SD=34\%$

### **3.2.9 Hepatozyten auf einer Laminin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Fibronectin angereicherten Kultur-Mediums (L/F)**

Zytokeratin 7 wies maximale Meßwerte am 10. Versuchstag auf und fiel dann wieder ab. Zytokeratin 8 hingegen zeigte eine konstante Expression bis zum 10. Versuchstag und einen starken Anstieg bis zum 20. Versuchstag. Zytokeratin 18 wies einen niedrigen initialen Meßwert am Versuchstag 1 auf, zum 20. Versuchstag kam es zu einem starken Anstieg der Meßwerte. Zytokeratin 19 zeigte einen Anstieg der Meßwerte bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall zum 20. Versuchstag. Vimentin zeigte eine kontinuierliche niedrige Expression während der Versuchsreihe.

Im Vergleich mit einem zweidimensionalen Laminin-Ansatz (L/0) war die Expression der Zytokeratine 7 und 19 sowie von Vimentin um 210% sowie um je 30% vermehrt. Die Expression der Zytokeratine 8 und 18 hingegen war um 40% respektive 16% supprimiert. (Abb. 16)

### **3.2.10 Hepatozyten auf einer Fibronectin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Laminin angereicherten Kultur-Mediums (F/L)**

Die Expression von Zytokeratin 7 wies eine konstante Expression bis zum 10. Versuchstag auf und stieg dann bis zu einem Maximum am 20. Versuchstag an. Zytokeratin 8 zeigte eine Persistenz der initialen Expression bis zum 10. Versuchstag und einen starken Anstieg bis zum 20. Versuchstag. Die Meßwerte für die Expression von Zytokeratin 18 zeigten einen passageren Abfall vom Initialwert und einen darauffolgenden Wiederanstieg zum 20. Versuchstag. Zytokeratin 19 zeigte einen deutlichen Anstieg der Meßwerte bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall zum 20. Versuchstag. Die Expression von Vimentin zeigte einen ähnlichen Anstieg bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall zum 20. Versuchstag.

Der dreidimensionale Fibronectin-Laminin-Ansatz (F/L) wies gegenüber dem zweidimensionalen (F/0) Fibronectin-Aufsatz eine deutliche Vermehrung der Expression der Zytokeratine 8 und 18 um 46% sowie 26% auf. Die Expression der Zytokeratine 7 und 19 hingegen war um 50% reduziert. Vimentin wies eine Konstanz der Meßwerte auf. (Abb. 17)

## Zytokeratine - Laminin + Fibronectin

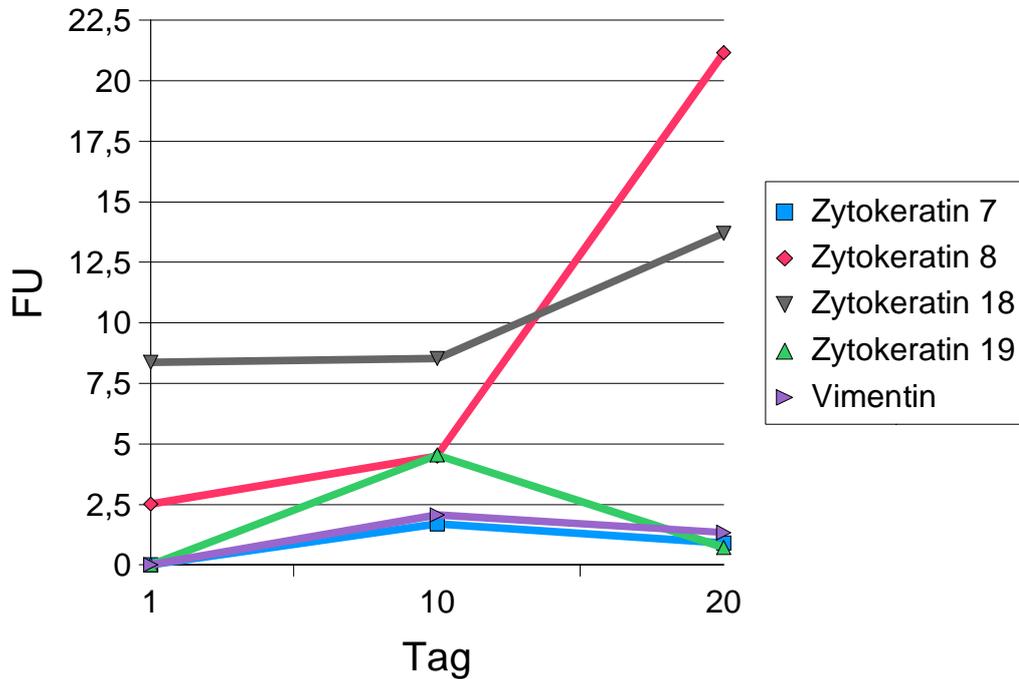


Abbildung 16: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Laminin-Matrix. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere  $SD=27\%$

## Zytokeratine - Fibronectin + Laminin

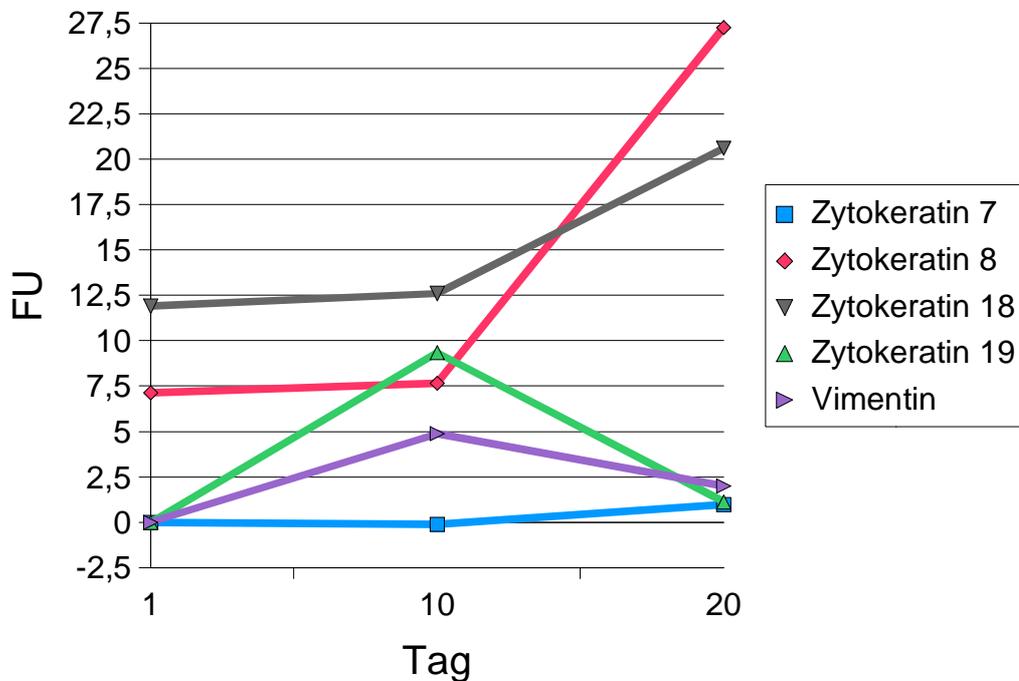


Abbildung 17: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Fibronectin-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Laminin angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere  $SD=33\%$

### **3.2.11 Hepatozyten auf einer Laminin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Laminin angereicherten Kultur-Mediums (L/L)**

Zytokeratin 7 wies im obigen Versuch den maximalen Anstieg der Werte zum Tag 10 und einen ebenso starken Abfall der Werte zum Versuchstag 20 auf. Zytokeratin 8 zeigte eine persistierende Expression bis zum 10. Versuchstag und einen maximalen Anstieg bis zum 20. Versuchstag. Die Meßwerte für Zytokeratin 18 zeigten einen Abfall bis zum 10. Versuchstag und einen Wiederanstieg zum 20. Versuchstag. Zytokeratin 19 zeigte einen Anstieg der Meßwerte bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall zum 20. Versuchstag. Vimentin wurde am 10. Versuchstag maximal exprimiert und fiel zum 20. Versuchstag wieder ab.

Im Vergleich mit dem zweidimensionalen Laminin-Ansatz (L/0) war die Expression der Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 sowie von Vimentin erhöht, wobei die vermehrte Expression von Zytokeratin 7 sowie von Vimentin mit 300% und 65% besonders prominent war. (Abb. 18)

### **3.2.12 Hepatozyten auf einer Fibronectin-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Fibronectin angereicherten Kultur-Mediums (F/F)**

Die Expression von Zytokeratin 7 wies ein Maximum am 10. Versuchstag auf und fiel dann wieder ab. Zytokeratin 8 hingegen zeigte eine konstante Expression bis zum 10. Versuchstag und einen starken Anstieg bis zum 20. Versuchstag. Zytokeratin 18 wies einen hohen initialen Meßwert am Versuchstag 1 auf, dieser wurde nach passagerem Absinken am 10 Tag am letzten Versuchstag wieder erreicht. Zytokeratin 19 zeigte einen Anstieg der Meßwerte bis zum 10. Versuchstag und einen Abfall zum 20. Versuchstag. Vimentin zeigte einen Anstieg zum 10. Versuchstag und einen geringen Abfall der Meßwerte zum Ende der Versuchsreihe.

Im Vergleich des dreidimensionalen Fibronectin-Fibronectin-Ansatzes (F/F) mit dem zweidimensionalen Fibronectin-Ansatz (F/0) bestehen keine signifikanten Unterschiede der Expression der Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 sowie von Vimentin. (Abb 19)

## Zytokeratine - Laminin + Laminin

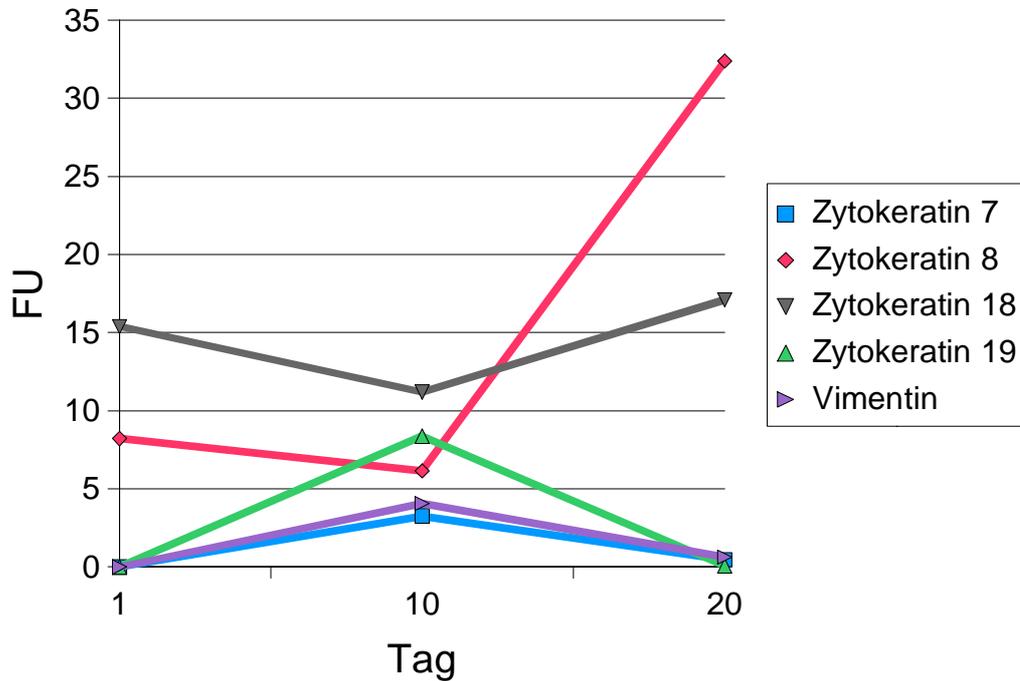


Abbildung 18: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Laminin-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Laminin angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=40%

## Zytokeratine - Fibronectin + Fibronectin

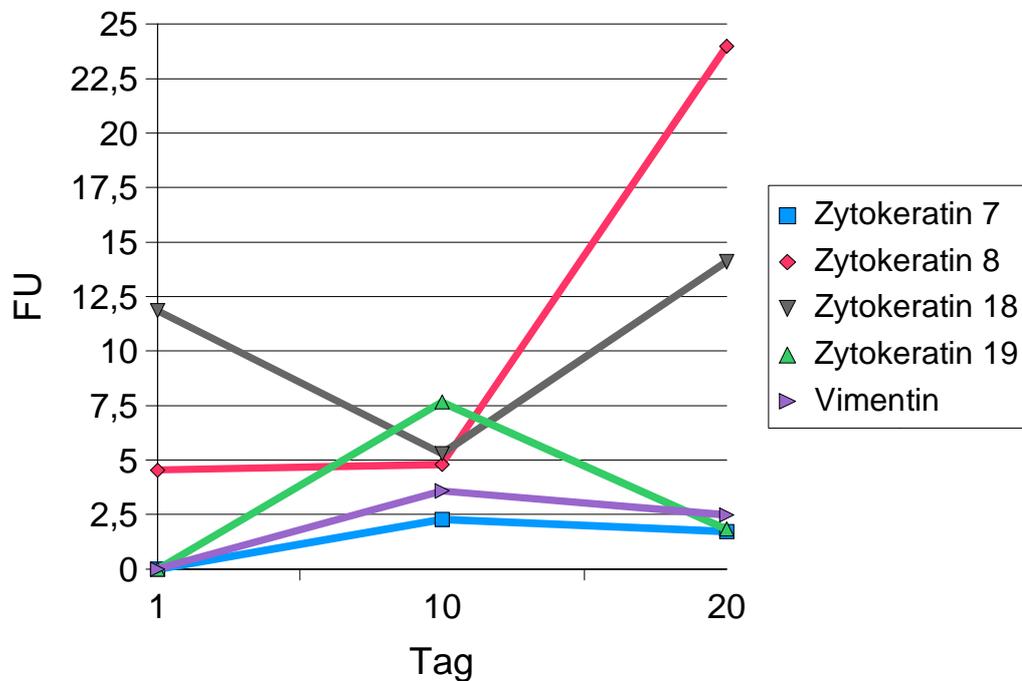


Abbildung 19: Nachweis des zeitlichen Verlaufes verschiedener Zytokeratine sowie von Vimentin auf einer Fibronectin-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Fibronectin angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

### **3.3 Western Blot-Analyse der Zytokeratine**

Zusätzlich zu den durchflußzytometrischen Messungen der Zytokeratine wurden diese auch in Western-Blot-Analysen untersucht. Angegeben sind die Zeitverlaufskurven der Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 als Analyse der optischen Dichte gegen die Anzahl der Versuchstage.

#### **3.3.1 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix (M/0)**

Die Expression von Zytokeratin 19 blieb über die Versuchsdauer konstant. Die Meßwerte für Zytokeratin 7 zeigten einen Abfall bis zum Versuchstag 20 und einen geringgradigen Wiederanstieg. Die Expression von Zytokeratin 8 nahm geringgradig ab, die Expression von Zytokeratin 18 zeigte einen deutlicheren Abfall von Versuchstag 1 bis Versuchstag 30. (Abb. 20, 21)

#### **3.3.2 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix (C/0)**

Zytokeratin 7 und 19 zeigten einen gleichbleibenden Verlauf über die Zeit. Die Expression von Zytokeratin 8 und 18 blieb während des Experimentes weitestgehend konstant. (Abb. 22, 23)

## Zytokeratine - Matrigel

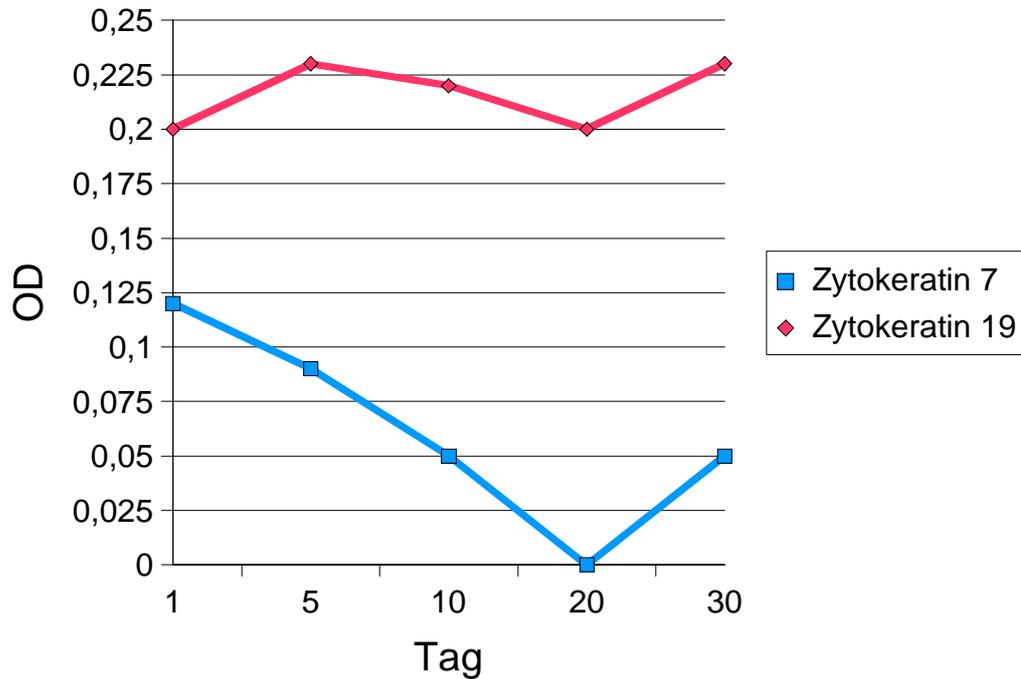


Abbildung 20: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 19 auf einer Matrigel-Matrix. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=20%

## Zytokeratine - Matrigel

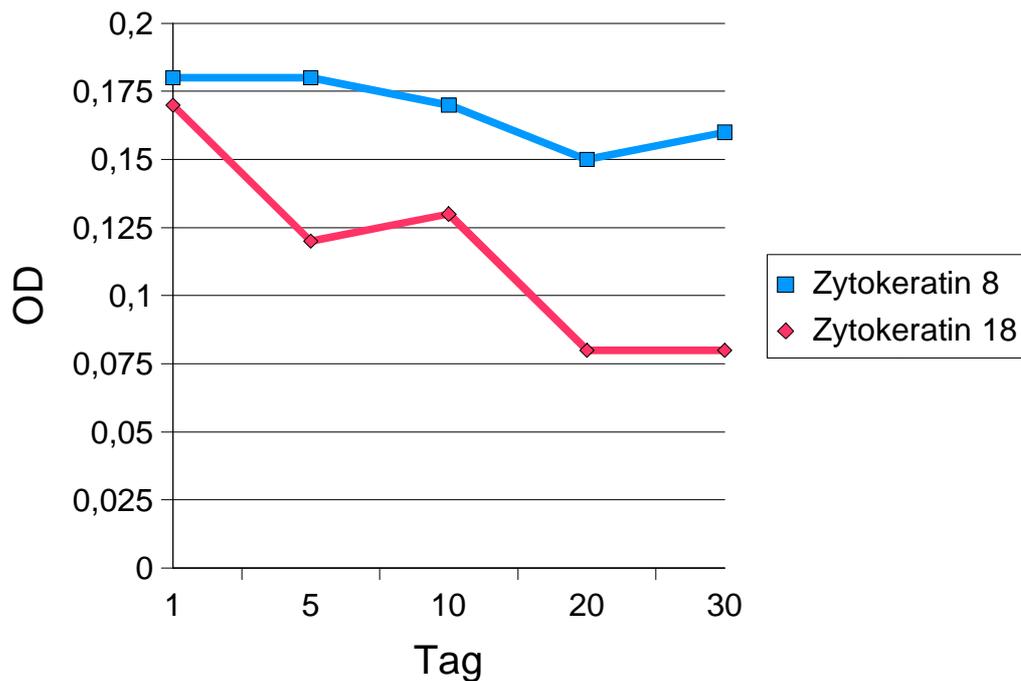


Abbildung 21: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 8 und 18 auf einer Matrigel-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=22%

## Zytokeratine - Collagen I

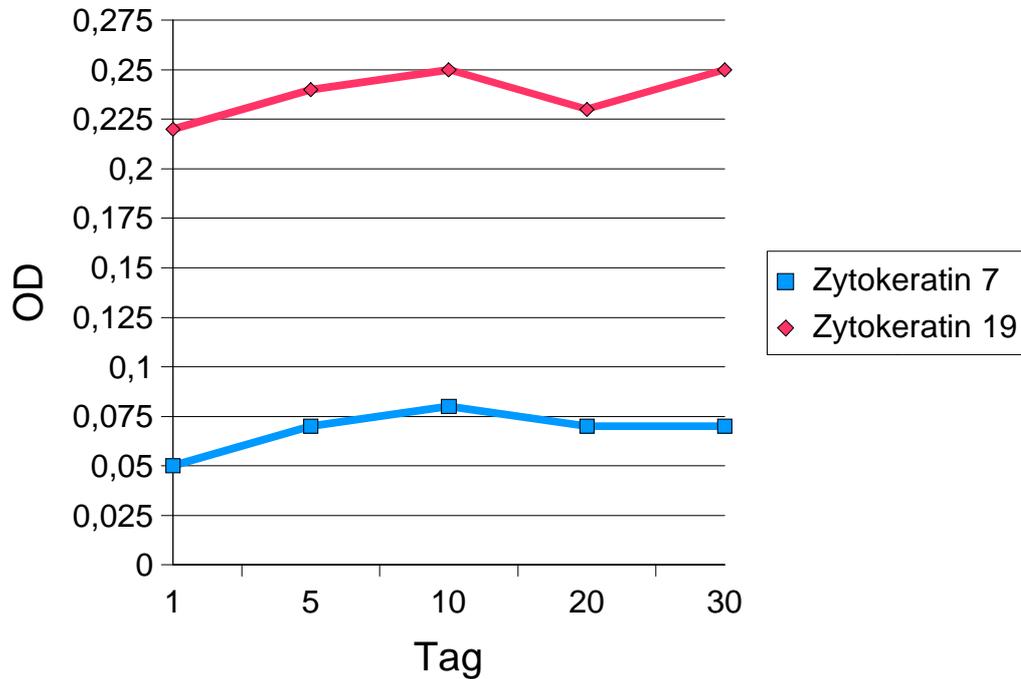


Abbildung 22: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 19 auf einer Collagen I-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=18%

## Zytokeratine - Collagen I

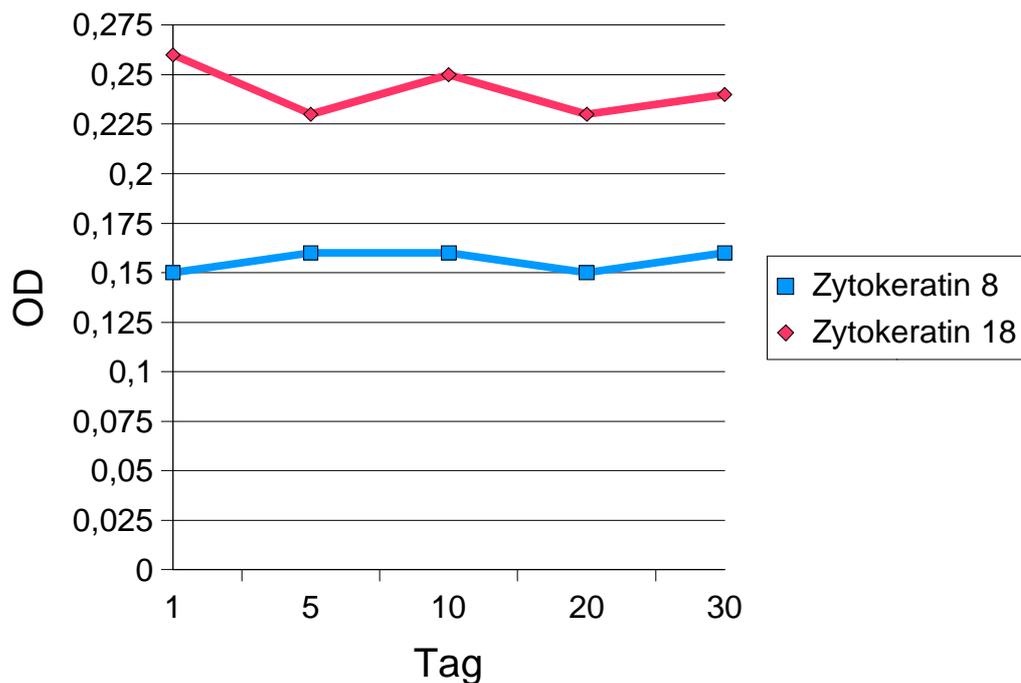


Abbildung 23: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 8 und 18 auf einer Collagen I-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=22%

### **3.3.3 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen-I angereicherten Kultur-Mediums (M/C)**

Die Expression von Zytokeratin 7 zeigte einen konstanten Verlauf, während die Expression von Zytokeratin 19 am 10. Versuchstag ein Minimum erreichte, um dann auf die vorherige Expression zurückzukehren. Die Expression von Zytokeratin 8 und 18 nahm anfangs geringgradig ab. Während jedoch die Expression von Zytokeratin 18 ihren Ausgangswert wieder erreichte und am Versuchstag 30 sogar übertraf, nahm die Expression von Zytokeratin 8 kontinuierlich ab. Im Vergleich mit dem zweidimensionalen Matrigel-Ansatz (M/0) zeigte sich im dreidimensionalen Matrigel-Collagen-Ansatz (M/C) eine Vermehrung der Zytokeratine 7 und 18, während die Zytokeratine 8 und 19 unveränderte Werte aufwiesen. (Abb. 24, 25)

### **3.3.4 Hepatozyten auf einer Collagen-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (C/M)**

Die Expression von Zytokeratin 7 zeigte einen konstanten Verlauf, während die Expression von Zytokeratin 19 kontinuierlich zunahm. Zytokeratin 8 und 18 zeigten einen kontinuierlichen Verlauf über den Zeitraum des Experimentes.

Im dreidimensionalen Collagen-Matrigel-Ansatz (C/M) stellte sich gegenüber dem zweidimensionalen Collagen-I-Ansatz (C/0) eine stärkere Expression der Zytokeratine 7 und 8 um 35% und 43% dar, die Zytokeratine 18 und 19 hingegen zeigten keine Veränderung ihrer Expression. (Abb 26,27)

## Zytokeratine - Matrigel + Collagen I

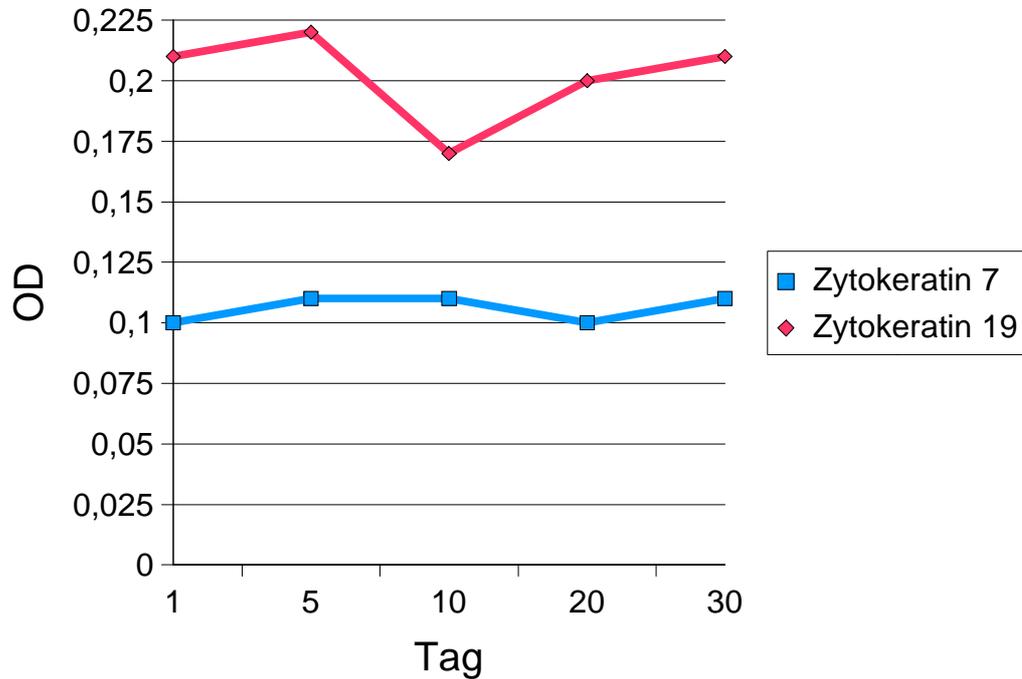


Abbildung 24: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 19 auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Collagen I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=17%

## Zytokeratine - Matrigel + Collagen I

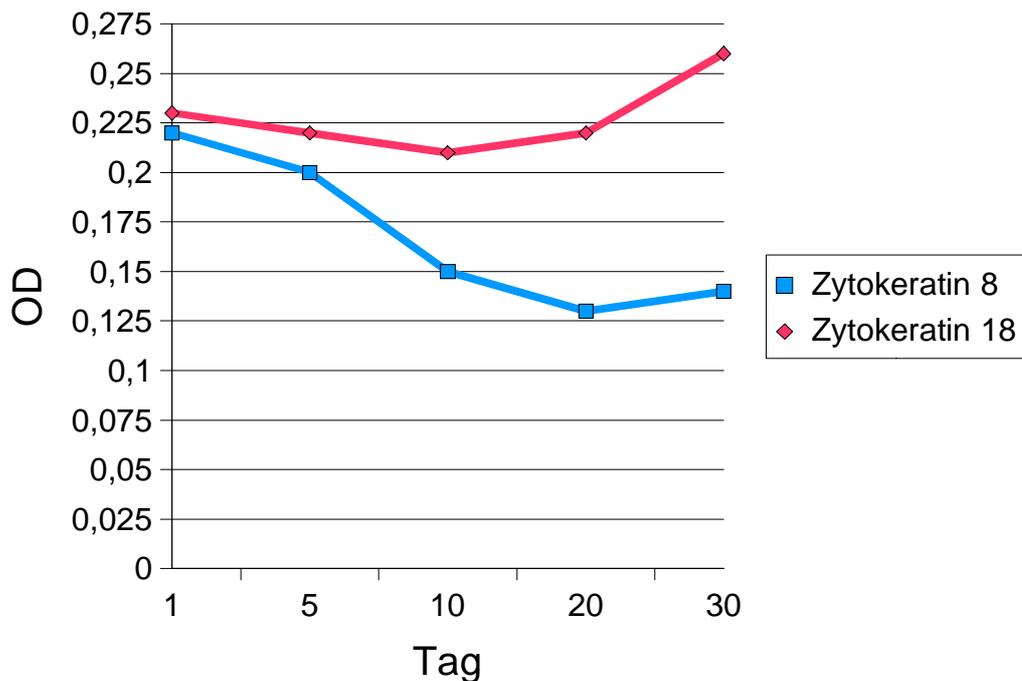


Abbildung 25: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 8 und 18 auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Collagen I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=23%

## Zytokeratine - Collagen I + Matrigel

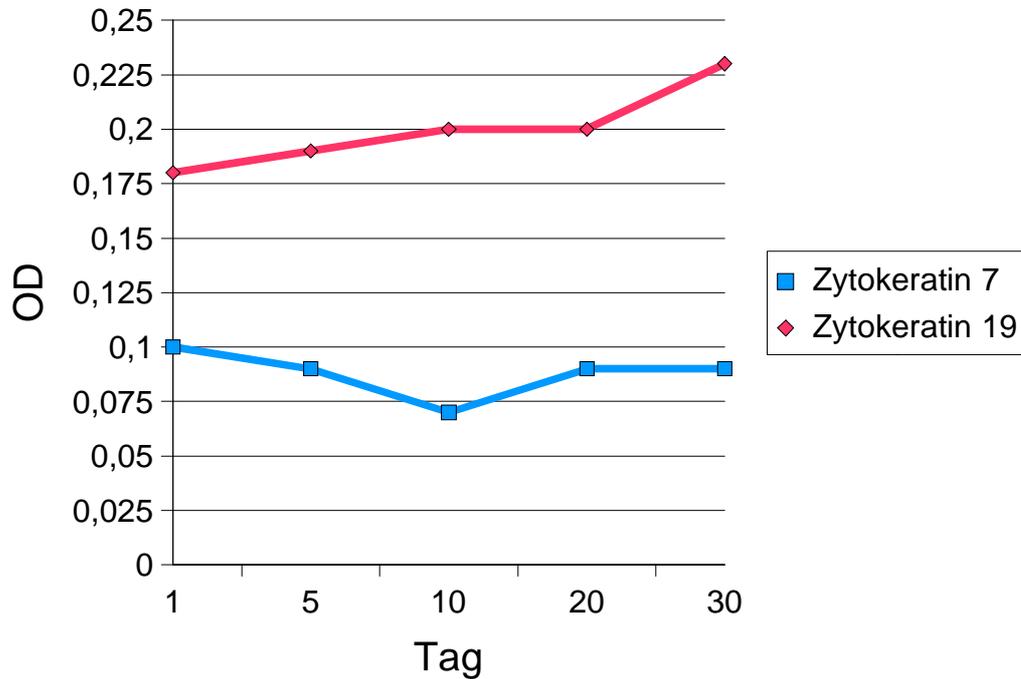


Abbildung 26: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 19 auf einer Collagen I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=22%

## Zytokeratine - Collagen I + Matrigel

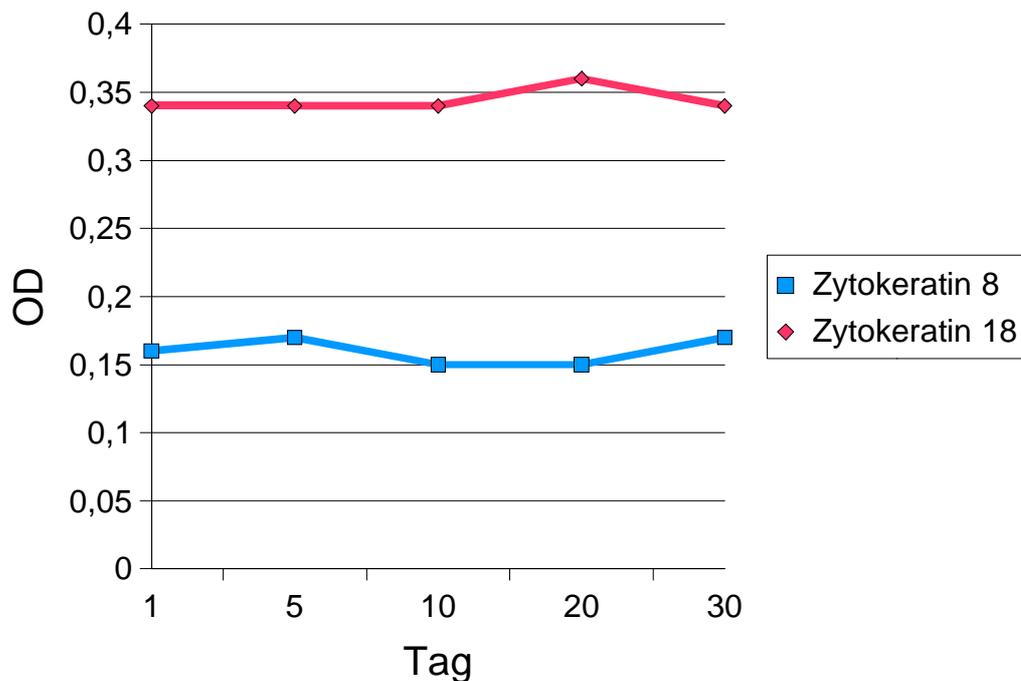


Abbildung 27: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 8 und 18 auf einer Collagen I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=20%

### **3.3.5 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Matrigel angereicherten Kultur-Mediums (M/M)**

Zytokeratin 7 zeigte einen Abfall der Meßwerte bis zum 10. Versuchstag, um dann wieder auf Ausgangswerte anzusteigen. Zytokeratin 19 wies einen Abfall der Meßwerte bis zum Versuchstag 20 auf, danach noch einen geringgradigen Anstieg zum Versuchstag 30.

Die Zytokeratine 7 und 18 ließen im dreidimensionalen Matrigel-Matrigel-Ansatz gegenüber dem zweidimensionalen Matrigel-Ansatz (M/0) eine vermehrte Expression 63% respektive 240% erkennen, während die Zytokeratine 8 und 19 eine konstante Expression zeigten. (Abb. 28, 29)

### **3.3.6 Hepatozyten auf einer Collagen-Matrix unter dem Einfluß eines mit flüssigem Collagen angereicherten Kultur-Mediums (C/C)**

Die Expression von Zytokeratin 7 zeigte einen konstanten Verlauf, während die Meßwerte für Zytokeratin 19 ab dem 10. Versuchstag kontinuierlich abnahmen. Die Meßwerte für Zytokeratin 18 nahmen kontinuierlich zu, während sich die Synthese von Zytokeratin 8 kontinuierlich verringerte.

Im Vergleich des dreidimensionalen Collagen-Collagen-Ansatzes (C/C) mit dem zweidimensionalen Collagen-Ansatz (C/0) war die Expression der Zytokeratine 7 und 18 um 40% sowie um 25% vermehrt, während die Expression von Zytokeratin 8 eine Verminderung um 25% aufwies. Zytokeratin 19 wies gegenüber der zweidimensionalen Kontrolle unveränderte Werte auf. (Abb. 30, 31)

## Zytokeratine - Matrigel + Matrigel

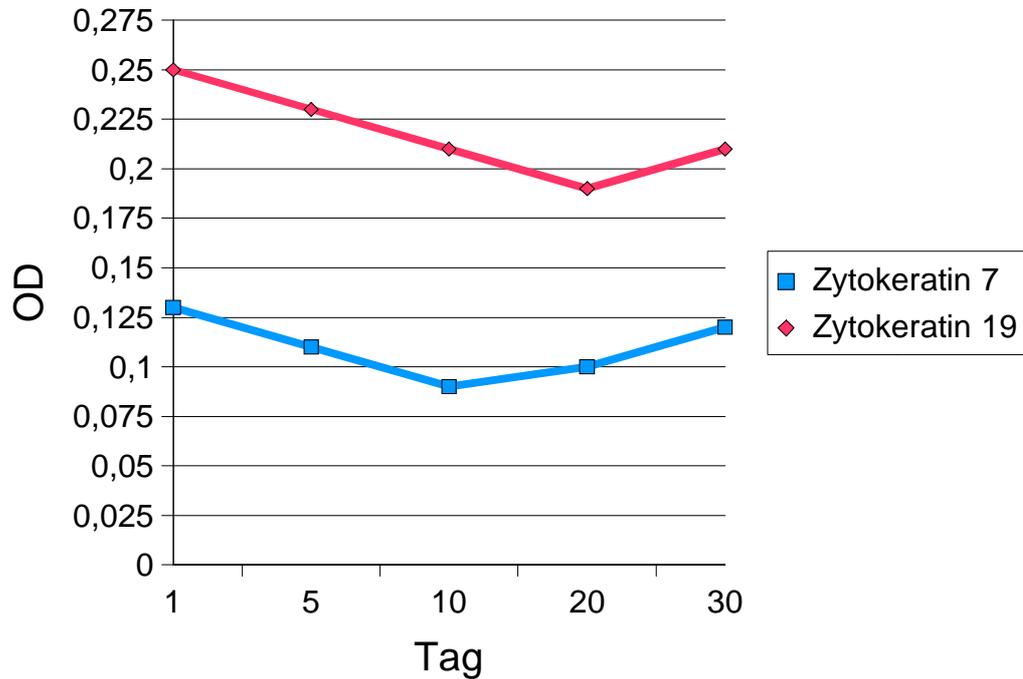


Abbildung 28: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 19 auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=19%

## Zytokeratine - Matrigel + Matrigel

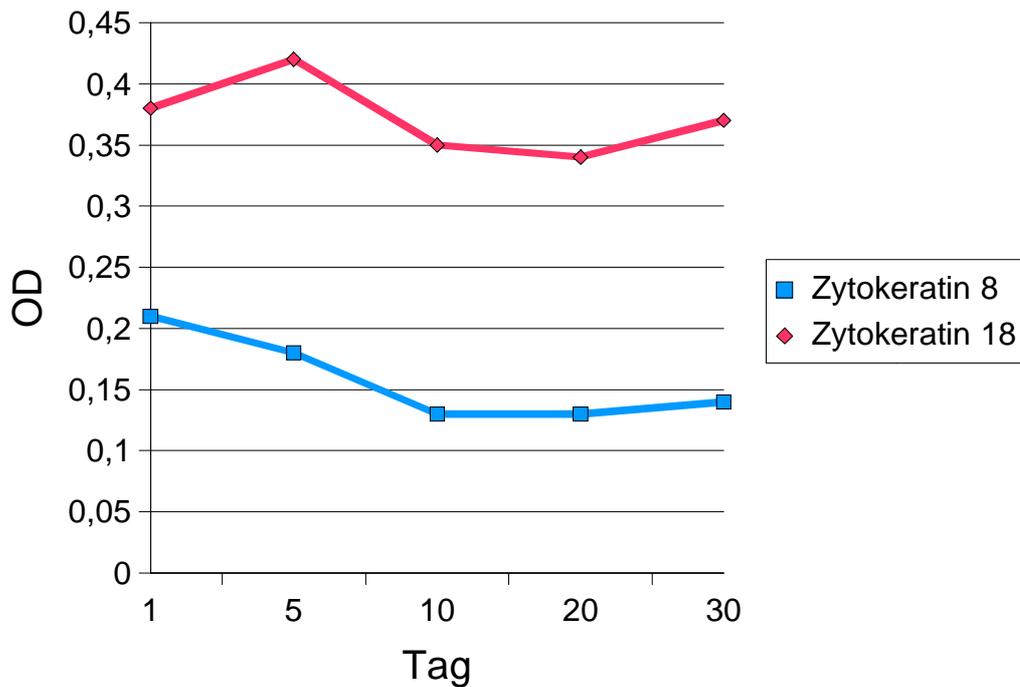


Abbildung 29: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 8 und 18 auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=18%

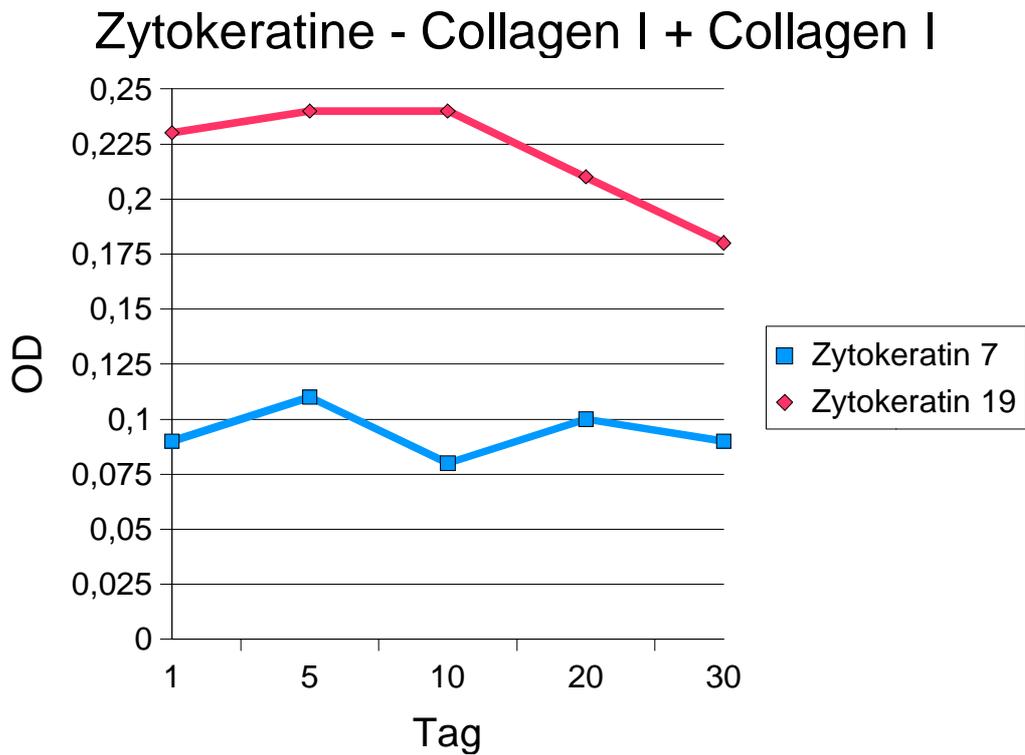


Abbildung 30: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 19 auf einer Collagen I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Collagen I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=24%

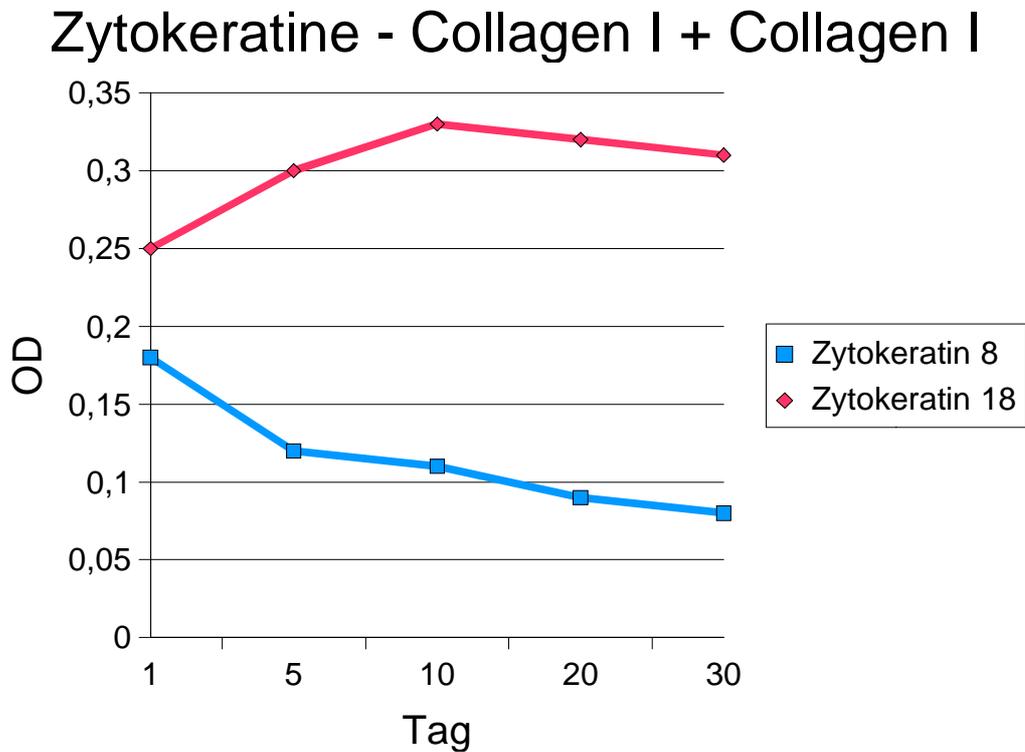


Abbildung 31: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Zytokeratine 7 und 18 auf einer Collagen I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit löslichem Collagen I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=21%

## **3.4 Zeitkurven für Integrine, ICAM-1, MHC-I und MHC-II**

Zur Ermittlung des Einflusses verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix auf die Expression der Zellrezeptoren Integrin  $\alpha 1$ - $\alpha 6$ , ICAM-1, MHC-I und MHC-II wurden Zellkulturen angelegt und wie angegeben verarbeitet. Die Rezeptor-Expressions-Kinetik der durchflußzytometrischen Analysen sind dargestellt. Wie in 3.1.1 dargestellt, gehen die Zeit-Fluoreszenz-Kurven für die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  von den angegebenen Ausgangswerten  $> 0$  aus, ebenso wie die Rezeptor-Expressionskinetik für ICAM-1, MHC-I und MHC-II. Diese wurden zur Übersichtlichkeit in den Nullpunkt verlegt. Die Zeit-Expressions-Kurven für die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  gehen von den angegebenen Ausgangswerten 0 aus.

### **3.4.1 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix (M/0)**

#### **3.4.1.1 Nichtstimulierte Hepatozyten**

Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  zeigten einen maximalen Anstieg bis zum 5. Versuchstag, danach kam es zu einem Abfallen der Meßwerte bis zu einem Wert oberhalb des Ausgangswertes. Die Kurve für Integrin  $\alpha 5$  zeigte einen ähnlichen Verlauf, jedoch war das Maximum in diesem Falle erst am 10. Versuchstag erreicht. Auch in diesem Falle resultierte ein darauffolgender Abfall der Meßwerte.

Die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  zeigten einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag. Danach kam es zu einem geringen Abfallen der Meßwerte, ohne daß jedoch die Ausgangswerte wieder erreicht wurden. (Abb. 32, 33)

## Integrine - Matrigel

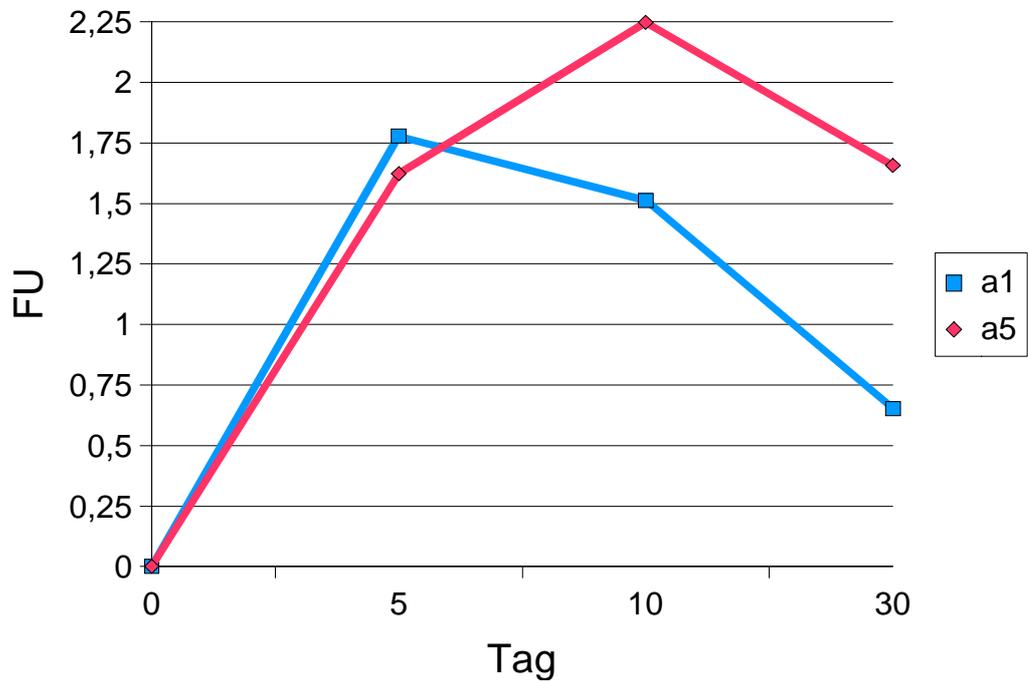


Abbildung 32: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=31%

## Integrine - Matrigel

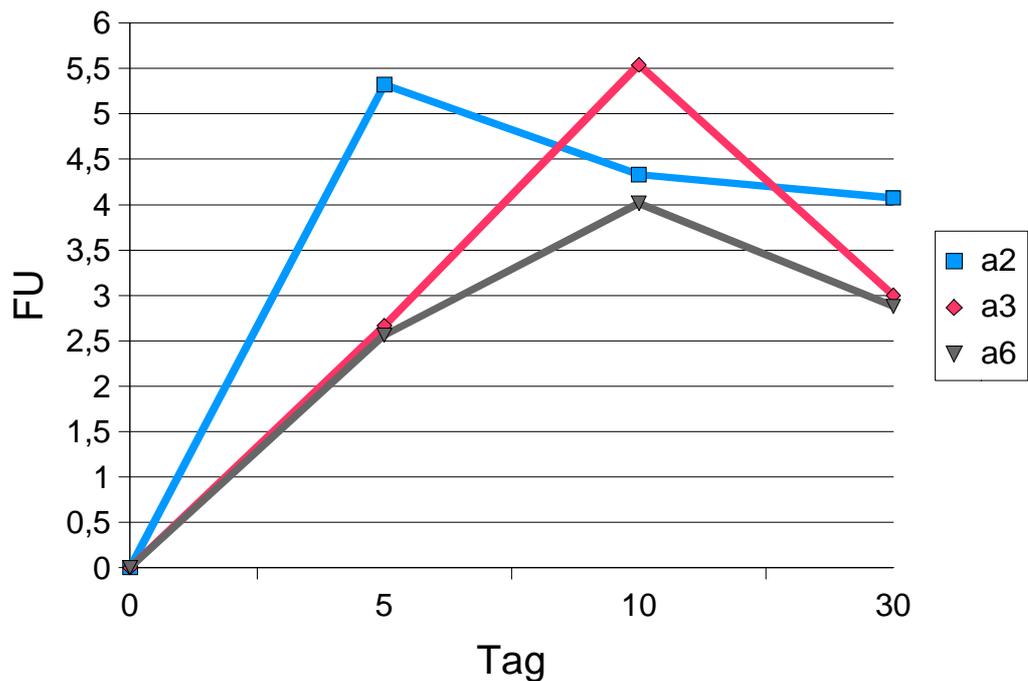


Abbildung 33: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=28%

### 3.4.1.2 Stimulation mit PGE2

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten auch unter Stimulation mit PGE2 einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag, der sich jedoch vom Anstieg der unstimulierten Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht signifikant unterschied, ein Unterschied zwischen Kontrollen und mit PGE2 stimulierten Zellen ließ sich somit nicht nachweisen.

Nach Stimulation mit PGE2 stiegen die Meßwerte für die Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  um 4% respektive 33% gegenüber den unstimulierten Kontrollen an, jedoch war ein statistisch signifikanter Unterschied nicht nachweisbar. Maximale Werte wurden wie bei den unstimulierten Kontrollen am 5. resp. 10. Versuchstag erreicht. Integrin  $\alpha 6$  zeigte keine Reaktion auf PGE2. Nach dem jeweiligen Maximum kam es zu einem Abfallen der Meßwerte, die Ausgangswerte wurden auch in diesem Falle nicht erreicht. (Abb. 34, 35)

## Integrine - Matrigel

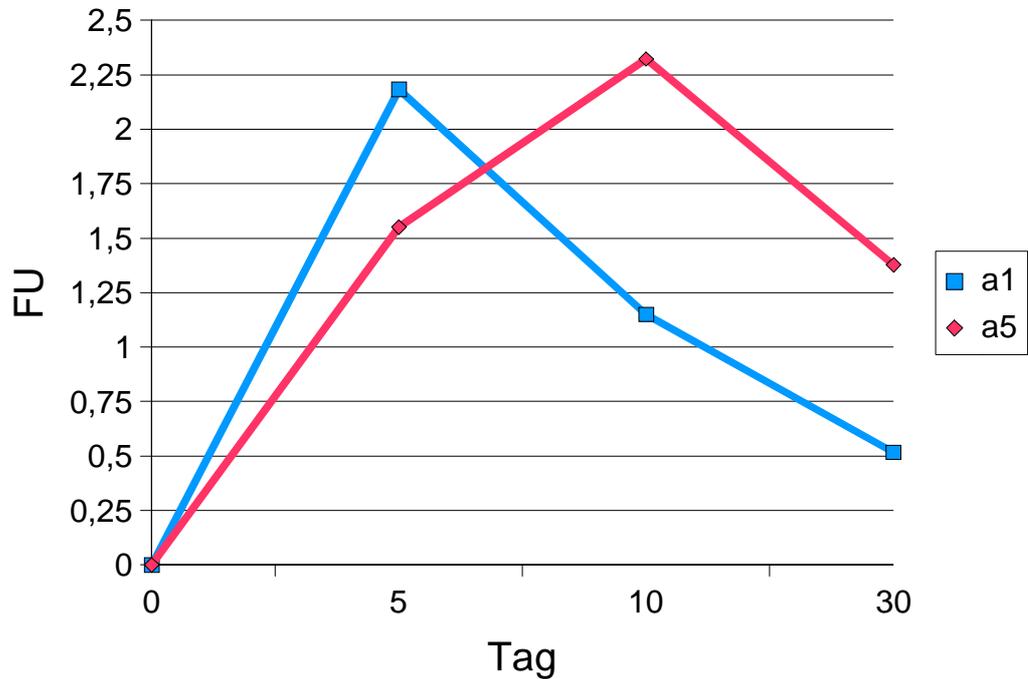


Abbildung 34: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=29%

## Integrine - Matrigel

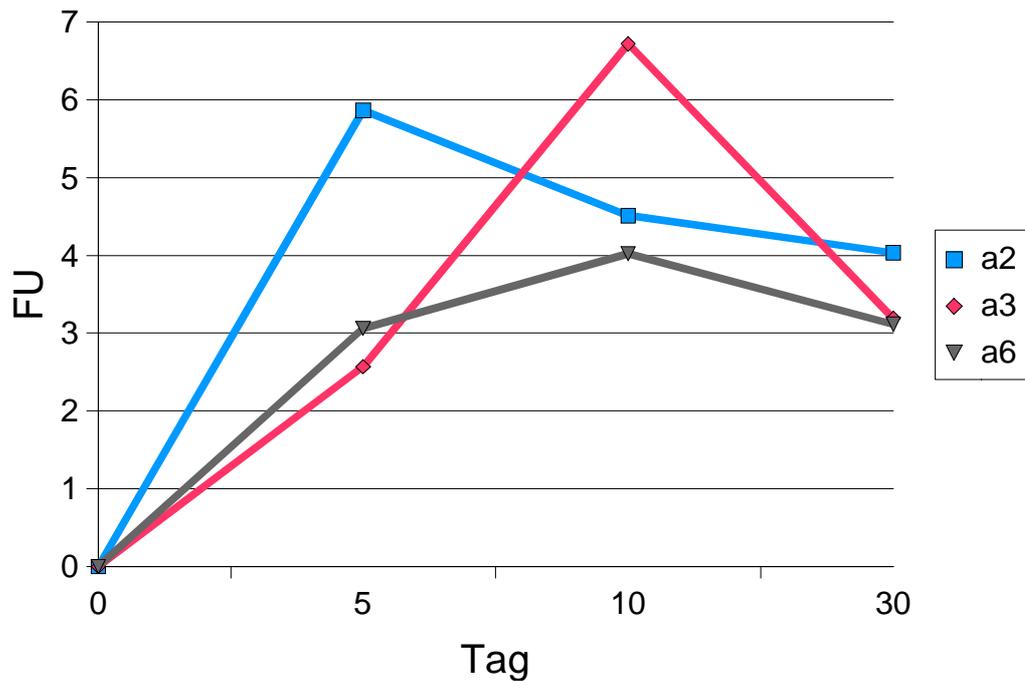


Abbildung 35: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=25%

### 3.4.1.3 Stimulation mit PMA

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten unter Stimulation mit PMA einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag, der sich vom Anstieg der unstimulierten Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht in signifikanter Form unterschied.

Nach Stimulation mit PMA stiegen die Meßwerte für die Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  gegenüber den unstimulierten Kontrollen um 46% respektive 16% sowie Integrin  $\alpha 2$  gegenüber den stimulierten Meßwerten durch PGE2 um 40% an. Integrin  $\alpha 3$  hingegen fiel um 5% gegenüber mit PGE2 stimulierten Hepatozyten ab. Maximale Werte wurden wie bei den unstimulierten Kontrollen am 5. resp. 10. Versuchstag erreicht. Eine Änderung der Proteinexpression von Integrin  $\alpha 6$  auf PMA ließ sich nicht nachweisen. (Abb. 36, 37)

## Integrine - Matrigel

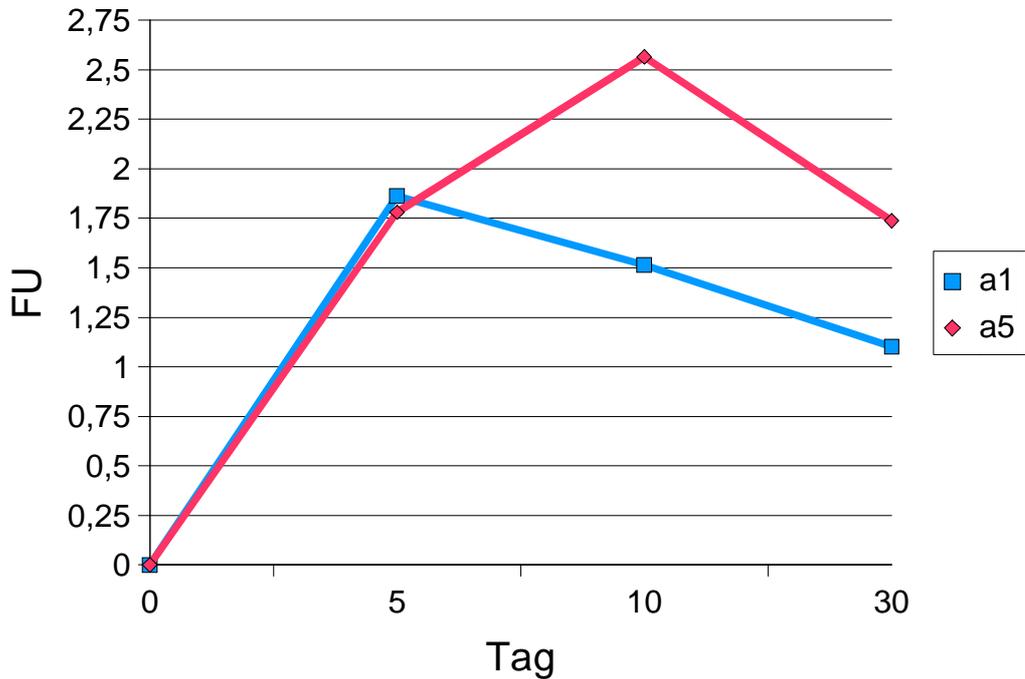


Abbildung 36: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PMA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=36%

## Integrine - Matrigel

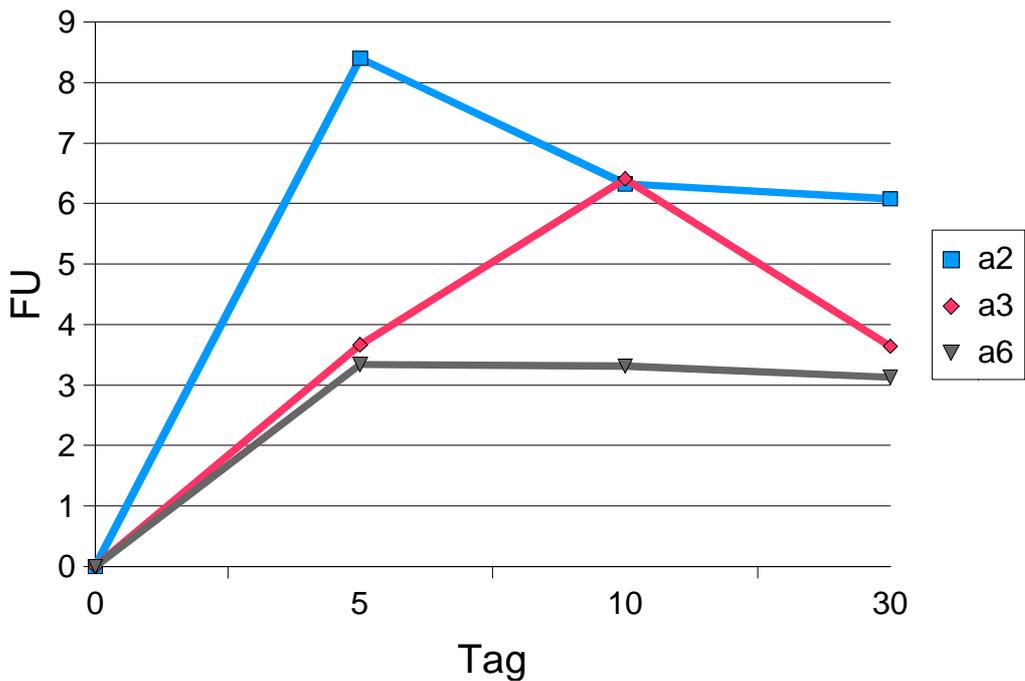


Abbildung 37: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PMA. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=25%

#### **3.4.1.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$**

Sowohl die Expression von ICAM als auch von MHC-I ließ sich durch IL-1 resp. IFN- $\gamma$  stimulieren, wobei am 5. Versuchstag ein maximaler Expressionsanstieg von 12% gegenüber unstimulierten Kontrollen meßbar war. MHC-I zeigte ein deutlicheres Ansprechen auf IL-1, so konnte am 10. Versuchstag ein maximaler Expressionsanstieg um 47% gemessen werden. MHC-II zeigte eine nur geringe Reaktion auf IFN- $\gamma$ , am 10. Versuchstag konnte ein maximaler Anstieg der Expression um 19% bestimmt werden. Eine statistische Signifikanz ließ sich jedoch nicht nachweisen. (Abb. 38)

## ICAM-I / MHC-I+II - Matrigel

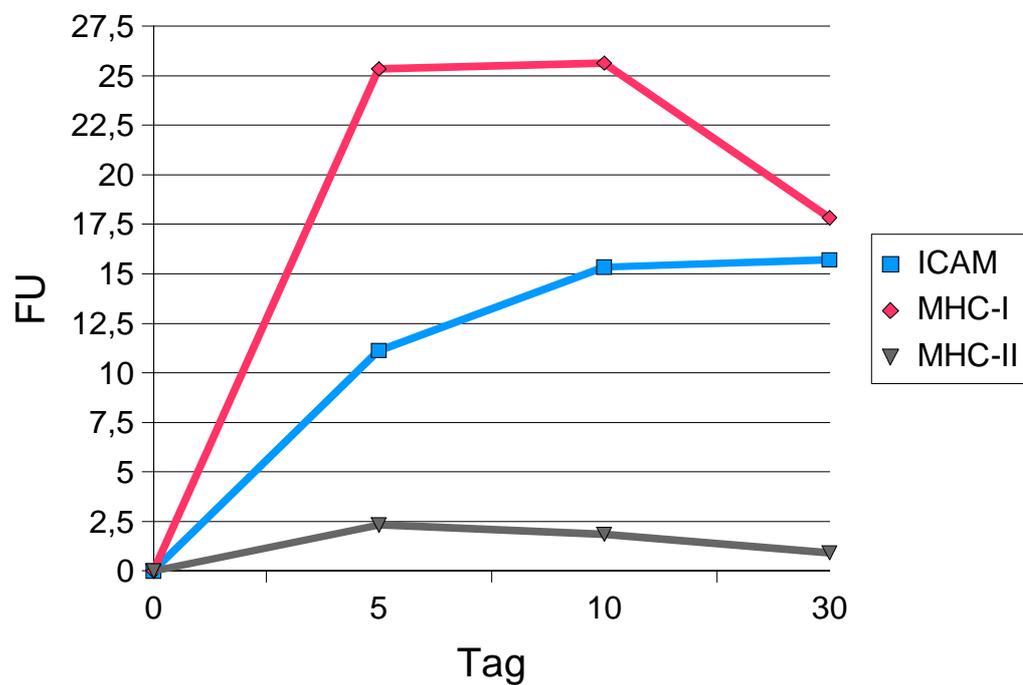


Abbildung 38: Nachweis des zeitlichen Verlaufes von ICAM-1 und MHC-I u. II auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit IL-1 (ICAM-1) resp. IFN- $\gamma$  (MHC-I+II). Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=31%

### **3.4.2 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix (C/0)**

#### **3.4.2.1 Nichtstimulierte Hepatozyten**

Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  zeigten einen maximalen Anstieg bis zum 5. Versuchstag, danach kam es zu einem Abfallen der Meßwerte bis zum Ausgangswert. Die Kurve für die Expression von Integrin  $\alpha 5$  zeigte einen raschen Anstieg zum Versuchstag 5 und persistierte auf diesem Wert.

Die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  zeigten einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag. Danach kam es zu einem geringen Abfallen der Meßwerte, ohne daß jedoch die Ausgangswerte wieder erreicht wurden.

Hepatozyten, die auf einer Collagen-I-Matrix ausgesät worden waren, wiesen unstimuliert an allen Versuchstagen im Durchschnitt niedrigere Expressionswerte für die Integrine  $\alpha 1$ –  $\alpha 6$  als Hepatozyten, die auf einer Matrigel-Matrix ausgesät worden sind, auf. (Abb. 39, 40)

## Intgerine - Collagen I

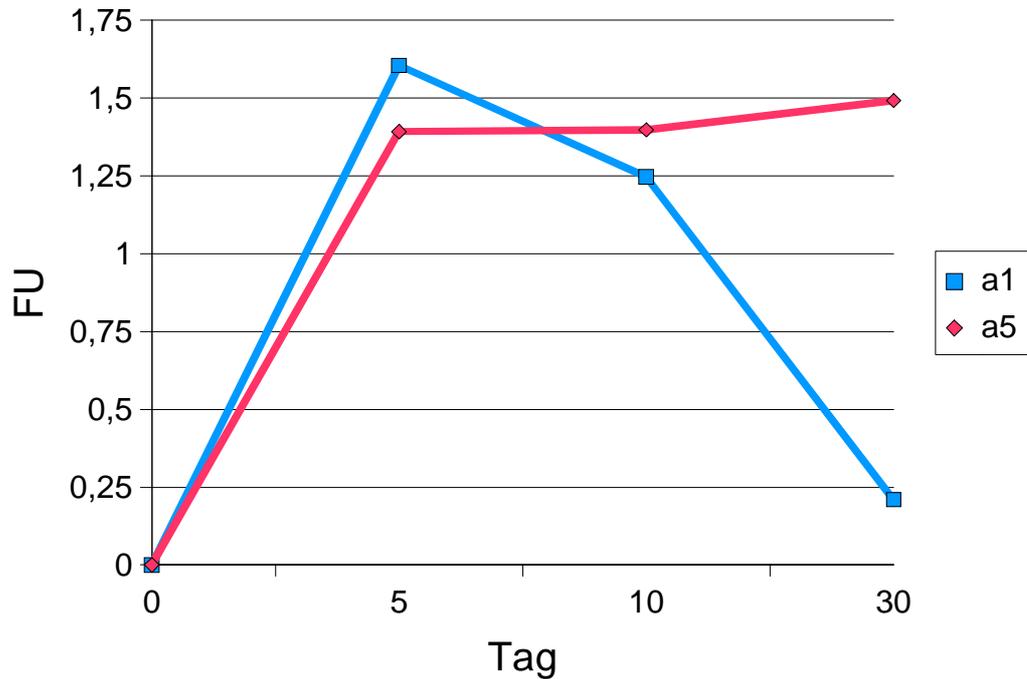


Abbildung 39: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=32%

## Integrine - Collagen I

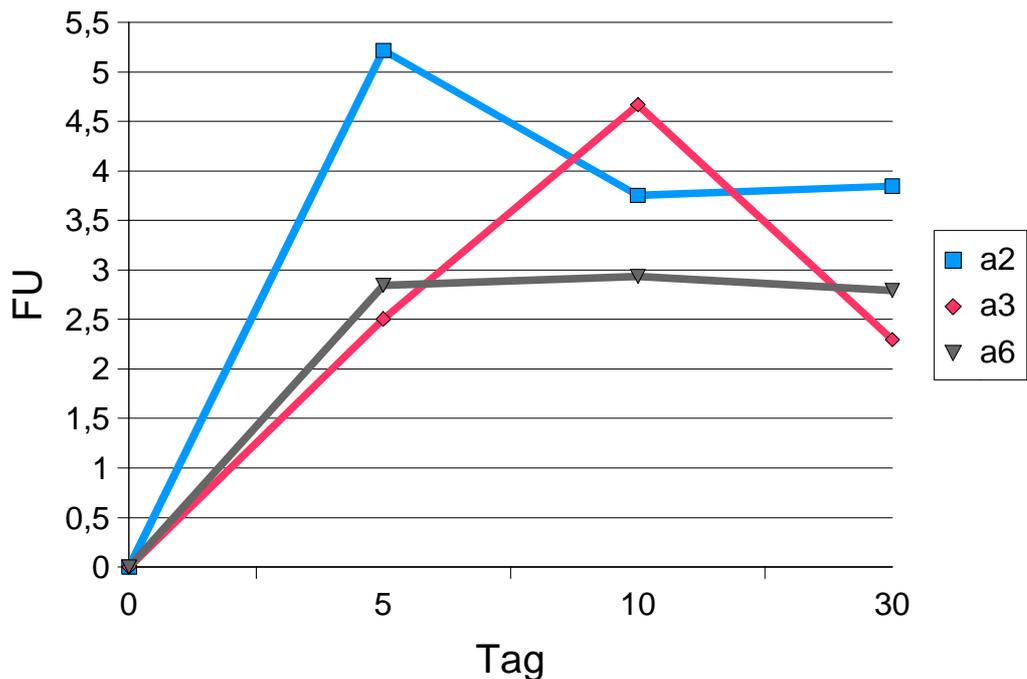


Abbildung 40: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=29%

### 3.4.2.2 Stimulation mit PGE 2

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten auch unter Stimulation mit PGE2 einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag, der sich jedoch vom Anstieg der unstimulierten Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht signifikant unterschied.

Nach Stimulation mit PGE2 kam es auf einer Collagen-I-Matrix nicht zu einem signifikanten Anstieg der Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , die Meßwerte erschienen gegenüber den unstimulierten Kontrollen vermindert. Die Expression des Integrins  $\alpha 6$  erschien unverändert zur Expression im unstimulierten Zustand. Im Vergleich mit Meßwerten, die auf einer Matrigel-Matrix (M/0) erhoben worden waren, stellte sich die Expression der Integrine  $\alpha 1$ –  $\alpha 6$  um durchschnittlich 10 % vermindert gegenüber der Expression auf einer Matrigel-Matrix dar. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Expression der Integrine  $\alpha 1$ –  $\alpha 6$  auf einer Matrigel- und einer Collagen-I-Matrix ließen sich jedoch unter Stimulation mit PGE2 nicht erheben. (Abb. 41, 42)

## Integrine - Collagen I

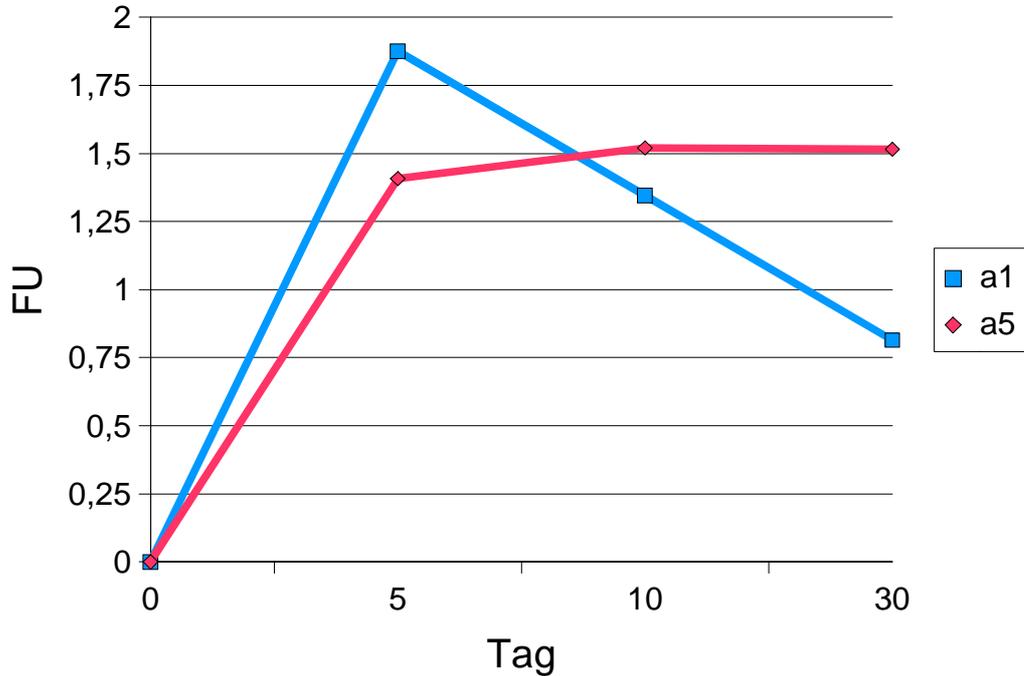


Abbildung 41: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=37%

## Integrine - Collagen I

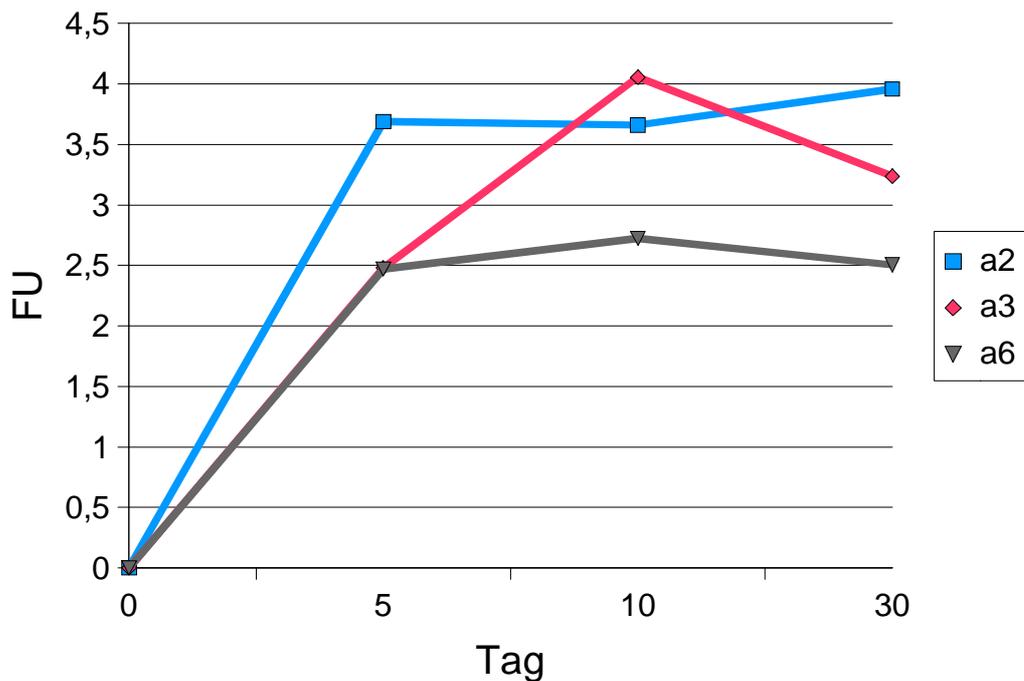


Abbildung 42: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=28%

### 3.4.2.3 Stimulation mit PMA

Ähnlich wie unter Stimulation mit PGE<sub>2</sub> kam es auf einer Collagen-I-Matrix nicht zu einem signifikanten Anstieg der Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$ , die Meßwerte erscheinen an den Versuchstagen 5 und 30 gegenüber den unstimulierten Kontrollen um 26 % vermehrt. Am Versuchstag 10 hingegen kam es zu einer Verminderung der Expressionswerte um ca. 3 %. Im Vergleich mit Meßwerten, die auf einer Matrigel-Matrix erhoben worden waren, stellte sich die Expression der Integrine  $\alpha 1$ –  $\alpha 6$  um durchschnittlich 10 % vermindert gegenüber der Expression auf einer Matrigel-Matrix dar. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Expression der Integrine  $\alpha 1$ –  $\alpha 6$  auf einer Matrigel- und einer Collagen-I-Matrix ließen sich jedoch unter Stimulation mit PMA nicht erheben. (Abb. 43, 44)

## Integrine - Collagen I

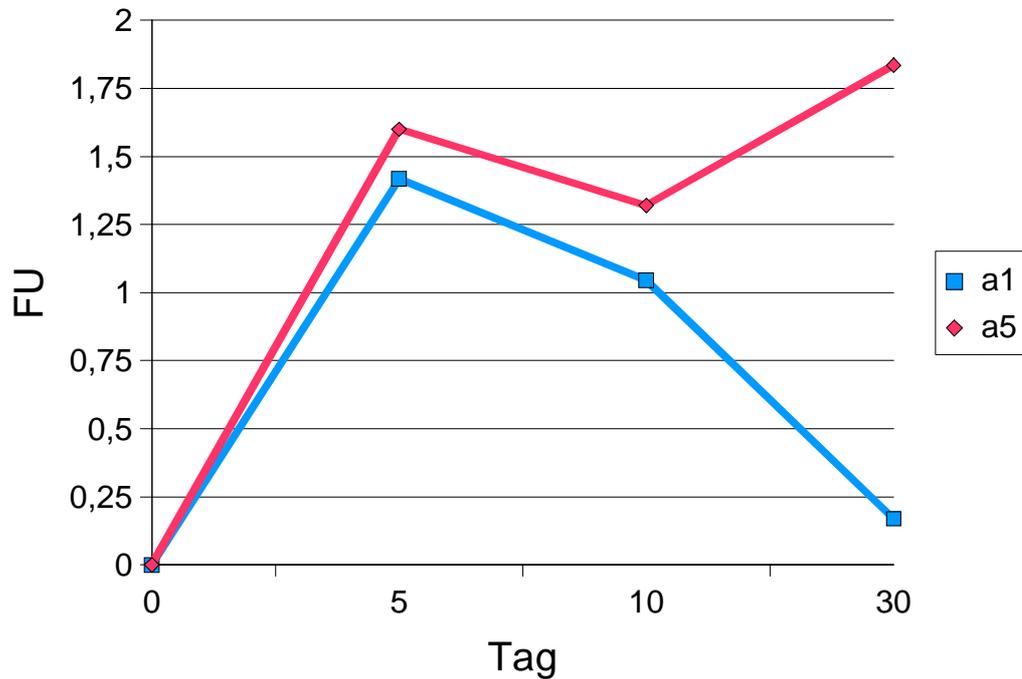


Abbildung 43: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PMA. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=35%

## Integrine - Collagen I

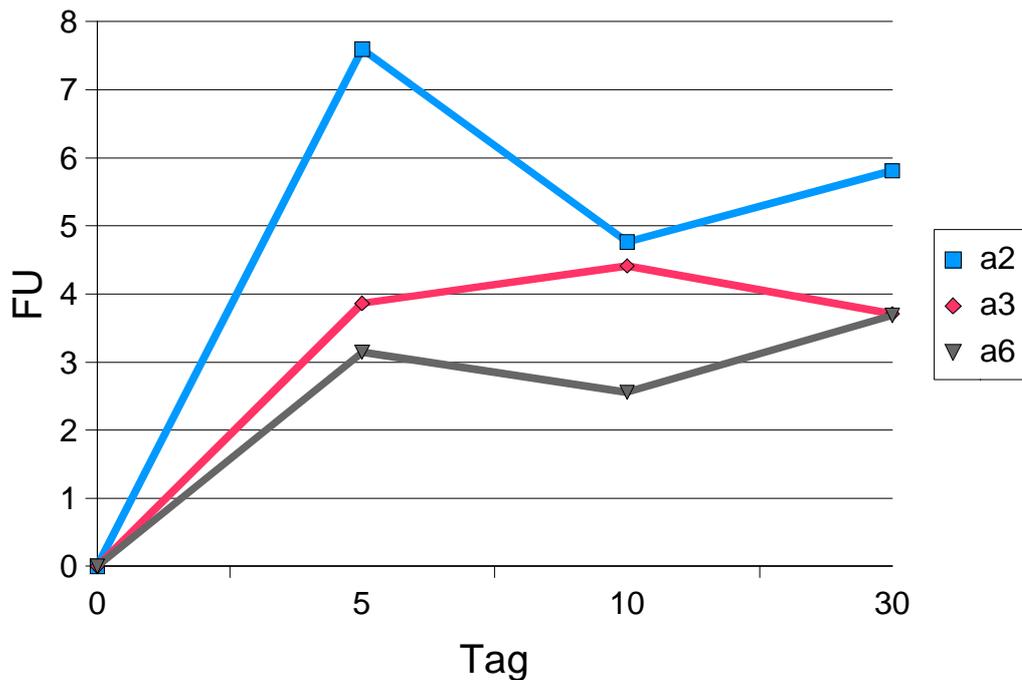


Abbildung 44: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PMA. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=34%

#### **3.4.2.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$**

Sowohl die Expression von ICAM-I und MHC-I ließ sich durch IL-1 resp. IFN- $\gamma$  stimulieren, allerdings in geringerem Grade als auf einer Matrigel-Matrix. MHC-II zeigte eine nur geringe Reaktion auf IFN- $\gamma$ .

Unter Stimulation mit IL-1 kam es zu einer vermehrten Expression von ICAM-I, das insbesondere am Versuchstag 10 eine um 18% höhere Expression verglichen mit den Werten von Hepatozyten, die auf Matrigel ausgesät worden sind, aufwies. Die Oberflächenrezeptoren MHC-I und MHC-II wurden jedoch um durchschnittlich 25% vermindert exprimiert, verglichen mit den Expressionswerten auf einer Matrigel-Matrix. (Abb. 45)

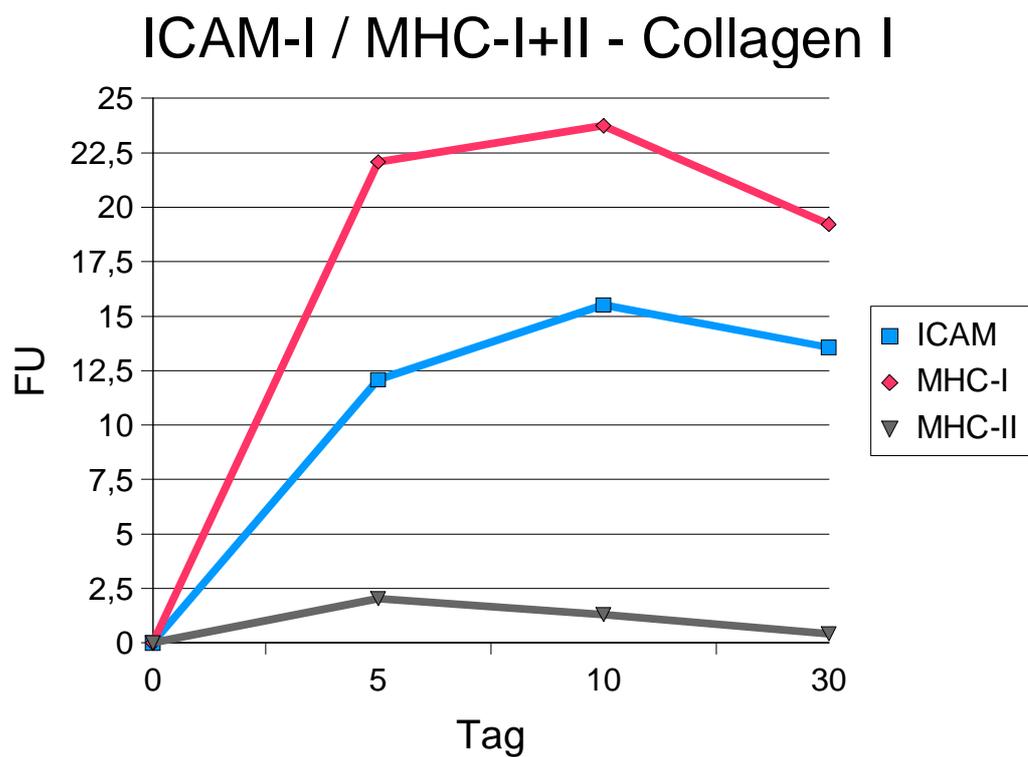


Abbildung 45: Nachweis des zeitlichen Verlaufes von ICAM-1 und MHC-I u. II auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit IL-1 (ICAM-I) resp. IFN- $\gamma$  (MHC-I+II). Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=28%

### **3.4.3 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit Collagen-I angereicherten Kulturmediums (M/C)**

#### **3.4.3.1 Nichtstimulierte Hepatozyten**

Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  zeigten einen maximalen Anstieg bis zum 5. Versuchstag, danach kam es am 10. Versuchstag zu einem Abfallen der Meßwerte mit nachfolgendem Wiederanstieg zum 30. Versuchstag.

Die Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  zeigten einen Anstieg bis zum 5. Versuchstag. Danach kam es zu einem deutlichen Abfallen der Meßwerte für Integrin  $\alpha 2$  mit nachfolgendem Wiederanstieg der Meßwerte.

Im Vergleich der Meßwerte für die Expression der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zwischen Hepatozyten, die auf einer basalen Matrigel-Matrix ausgesät worden waren (M/0), und Hepatozyten, die in einem Sandwich-Ansatz zwischen einer basalen Matrigel-Matrix und darüber befindlichem Collagen-I kultiviert worden waren (M/C), ließ sich eine vermehrte Expression der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  um 12% zeigen. Die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  hingegen wurden um durchschnittlich 20% vermindert exprimiert. (Abb. 46, 47)

## Integrine - Matrigel + Collagen I

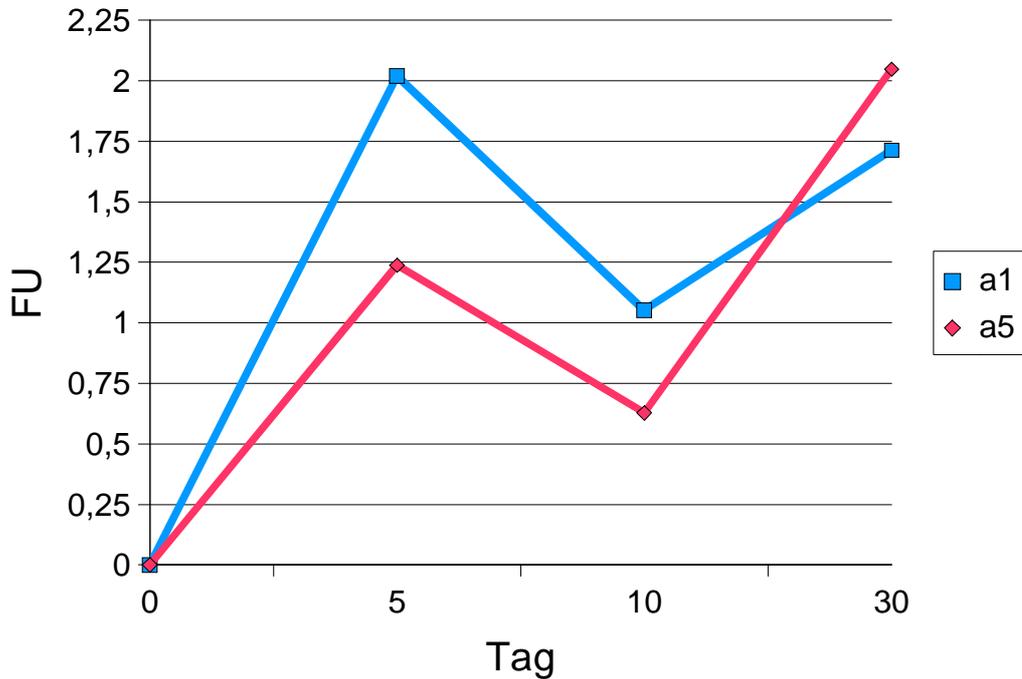


Abbildung 46: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=35%

## Integrine - Matrigel + Collagen I

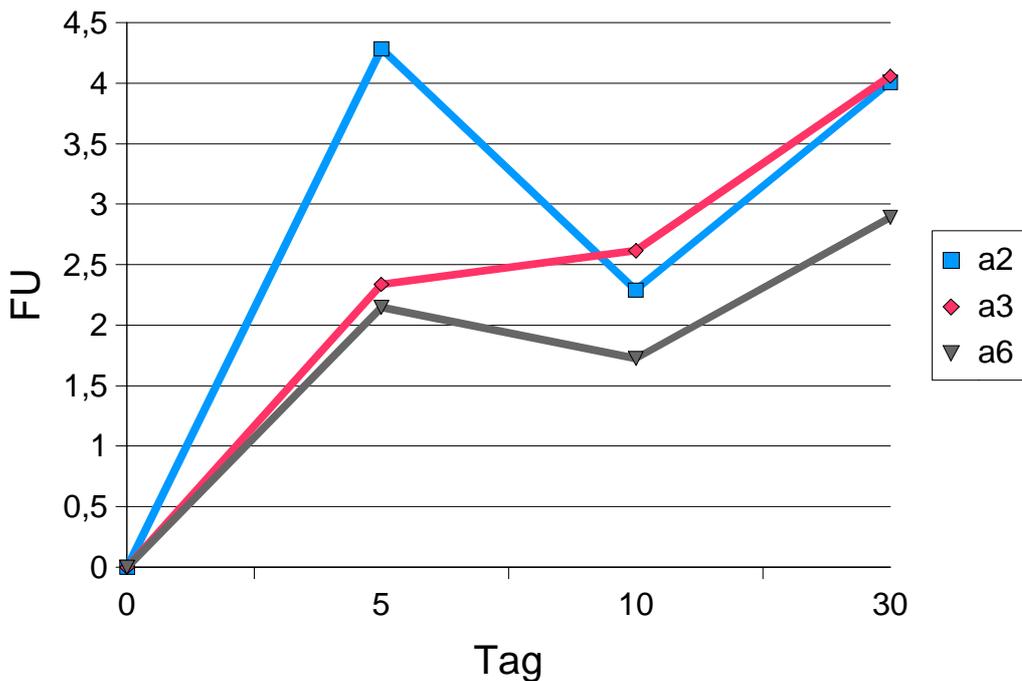


Abbildung 47: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=33%

### 3.4.3.2 Stimulation mit PGE 2

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten auch unter Stimulation mit PGE<sub>2</sub> einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag, der sich jedoch vom Anstieg der unstimulierten Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht signifikant unterschied.

Eine signifikante Veränderung der Meßwerte der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub> ließ sich gegenüber unstimulierten Kontrollen nicht nachweisen.

Im Vergleich mit der stimulierten Expression der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zwischen Hepatozyten, die auf einer basalen Matrigel-Matrix ausgesät worden waren (M/0), und Hepatozyten, die sich im Sandwichansatz zwischen einer basalen Kollagen-Schicht und darüber befindlichem Collagen-I befanden (M/C), ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede darstellen. Die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  wurden um ca. 25 % vermindert exprimiert.

Im Vergleich der Expression der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Expression unter Stimulation mit PGE<sub>2</sub> und ohne Stimulation nachweisen. (Abb. 48, 49)

## Integrine - Matrigel + Collagen I

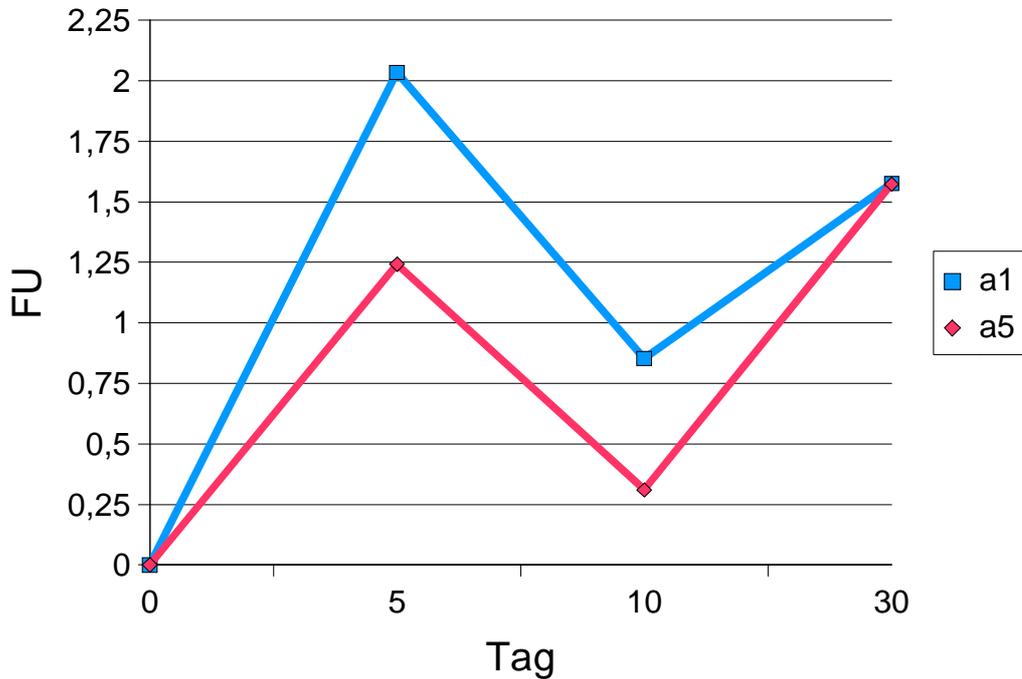


Abbildung 48: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=31%

## Integrine - Matrigel + Collagen I

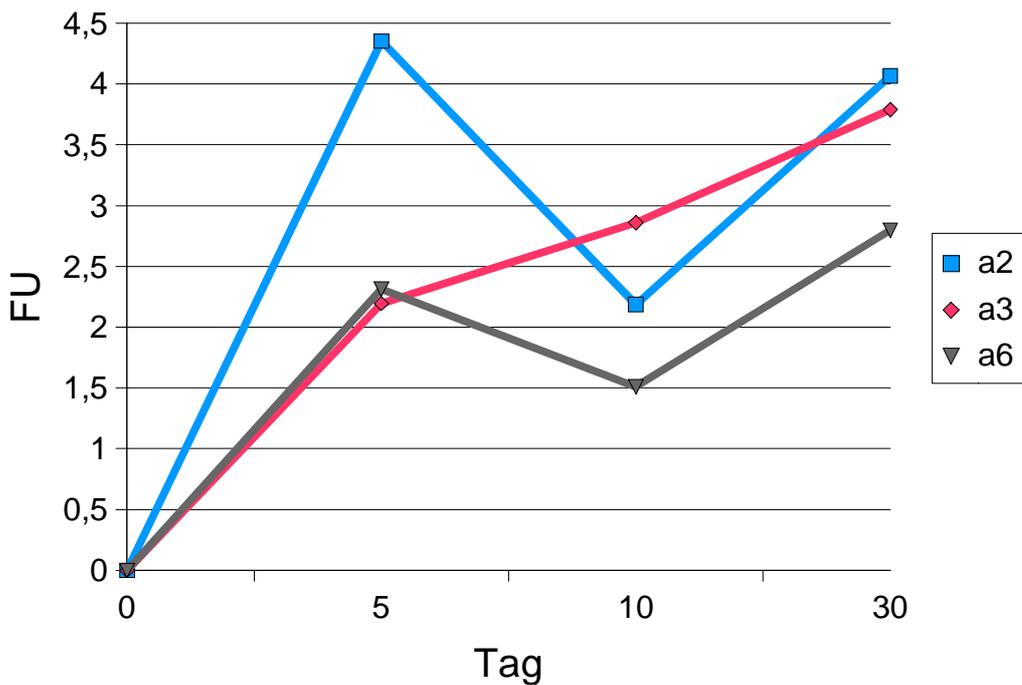


Abbildung 49: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=32%

### **3.4.3.3 Stimulation mit PMA**

Nach Stimulation mit PMA zeigten die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  einen deutlichen Anstieg der Meßwerte zum 5. Versuchstag. Zum 10. Versuchstag sank die Expression der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  deutlich ab, um zum 30. Versuchstag wieder anzusteigen.

Nach Stimulation mit PMA stiegen die Meßwerte für die Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  gegenüber den unstimulierten Kontrollen an, sie lagen dabei um 26% oberhalb der Kontrollwerte. Integrin  $\alpha 6$  zeigte sich gegenüber unstimulierten Meßwerten unverändert.

Vergleichsmessungen zwischen Hepatozyten, die in einem Sandwich-Ansatz zwischen Matrigel und Collagen-I (M/C) in Kultur gehalten wurden, und Hepatozyten, die auf einer basalen Matrigel-Matrix (M/O) ausplattiert wurden, ergaben, daß die Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  im Sandwich-Ansatz deutlich niedrigere Meßwerte (Verminderung um 42%) gegenüber Hepatozyten in der „single gel technique“ (M/O) aufwiesen. (Abb. 50, 51)

## Integrine - Matrigel + Collagen I

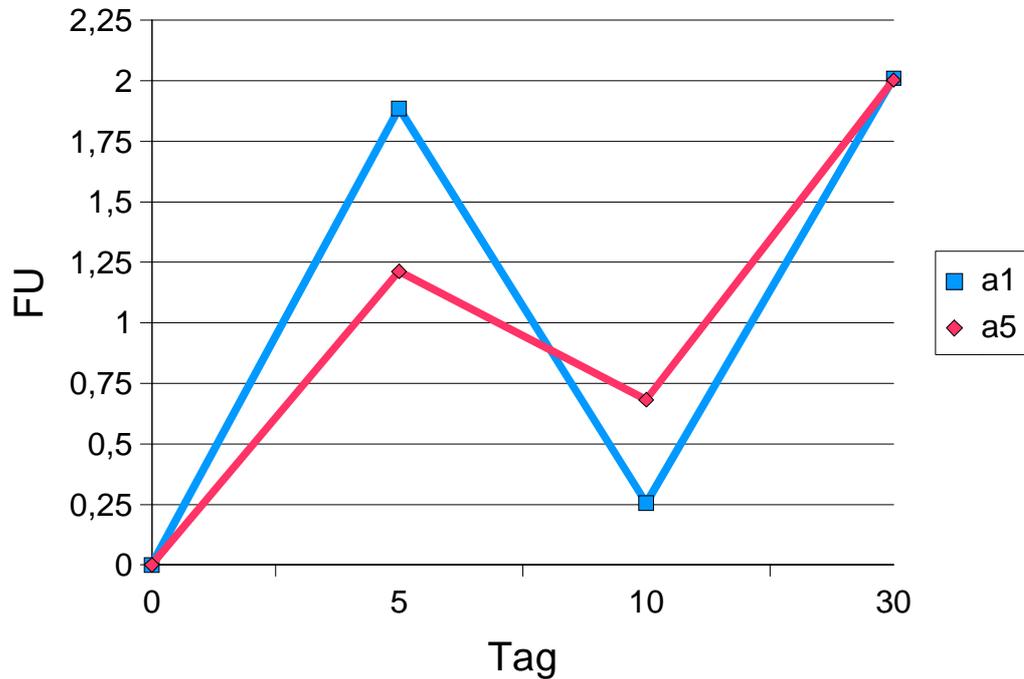


Abbildung 50: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=31%

## Integrine - Matrigel + Collagen I

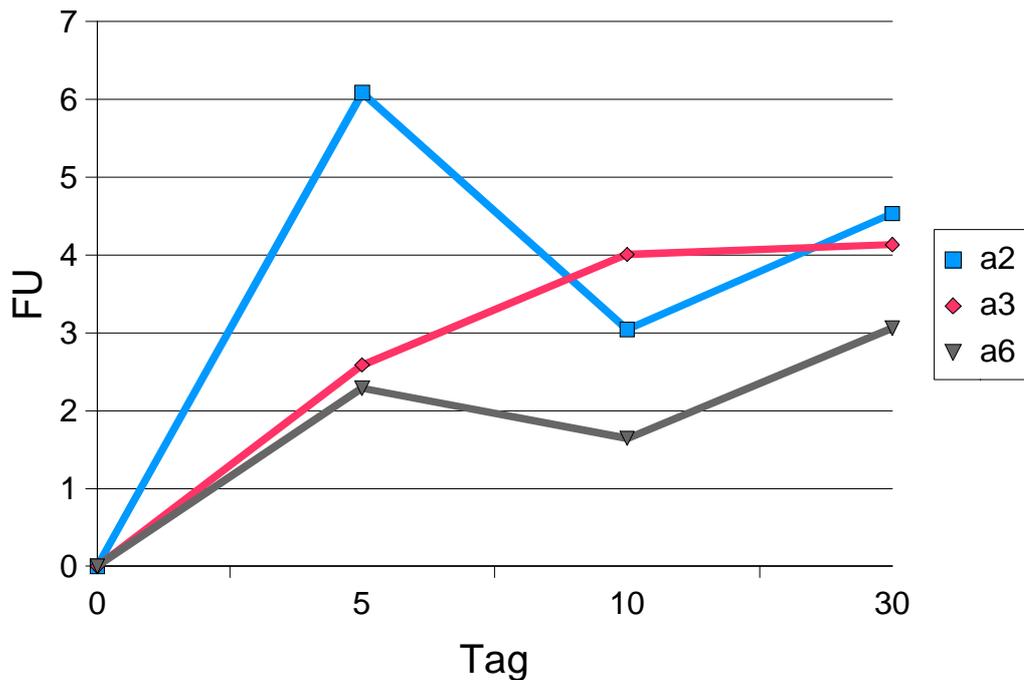


Abbildung 51: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

### **3.4.3.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$**

Nach Stimulation von ICAM-I durch IL-1 kam es zu einer Aufregulierung des Oberflächenrezeptors bis auf 202 %. MHC-I ließ sich ebenso stimulieren, hierbei lagen die Meßwerte für stimuliertes MHC-I um 160% über den unstimulierten Kontrollen. MHC-II hingegen zeigte keine Reaktion auf Stimulation mit IFN- $\gamma$ .

Im Vergleich der Meßwerte des Sandwichansatzes (M/C) gegenüber den Meßwerten, die auf einer basalen Matrigel-Matrix (M/0) unter Stimulation mit IL-1 bestimmt worden waren, zeigten sich die Meßwerte für ICAM-I, MHC-I und MHC-II im Sandwich-Ansatz jedoch um 17% reduziert. (Abb. 52)

## ICAM-I / MHC-I+II

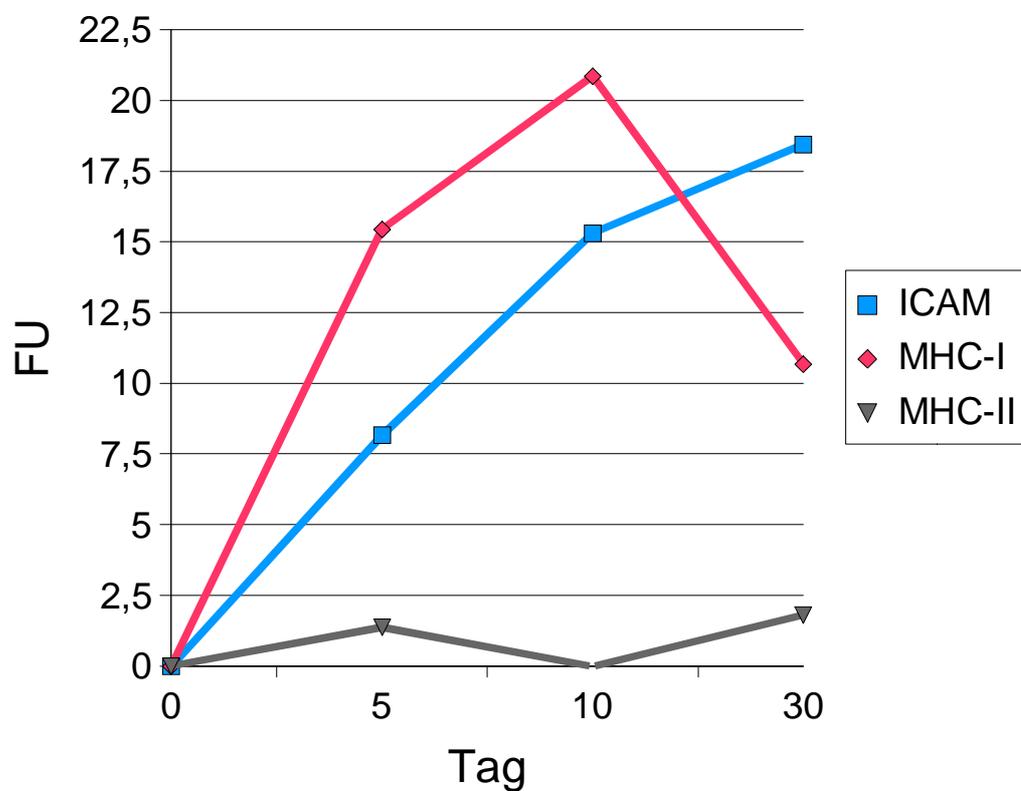


Abbildung 52: Nachweis des zeitlichen Verlaufes von ICAM-1 und MHC-I u. II auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit IL-1 (ICAM-1) resp. IFN- $\gamma$  (MHC-I+II). Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=34%

### **3.4.4 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit Matrigel angereicherten Kulturmediums (C/M)**

#### **3.4.4.1 Nichtstimulierte Hepatozyten**

Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  zeigten einen maximalen Anstieg bis zum 5. Versuchstag, danach kam es zu einem Abfallen der Meßwerte. Die Expression von Integrin  $\alpha 5$  zeigte einen kontinuierlichen Anstieg.

Gegenüber Hepatozyten, die auf einer basalen Collagen-I-Schicht ausgesät worden waren (C/0), erschienen die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  um etwa 30% erhöht. Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 5$  hingegen zeigten keine signifikante Veränderung. Die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  zeigten keine Veränderung in Abhängigkeit von einer Zugabe von flüssigem Collagen-I im Kulturmedium. (Abb. 53, 54)

## Integrine - Collagen I + Matrigel

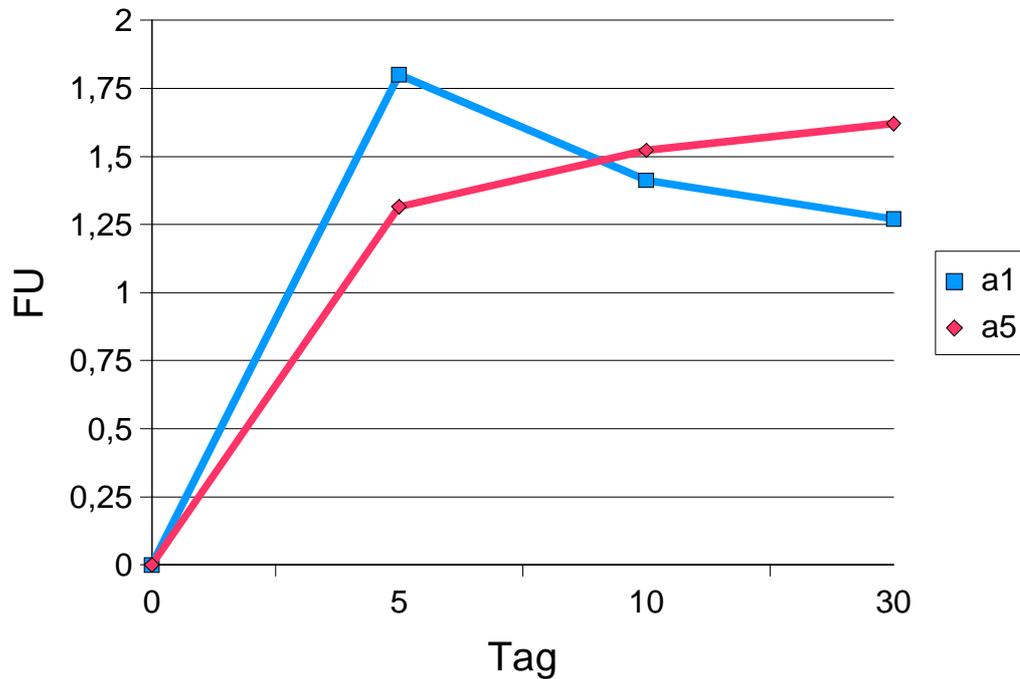


Abbildung 53: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=28%

## Integrine - Collagen I + Matrigel

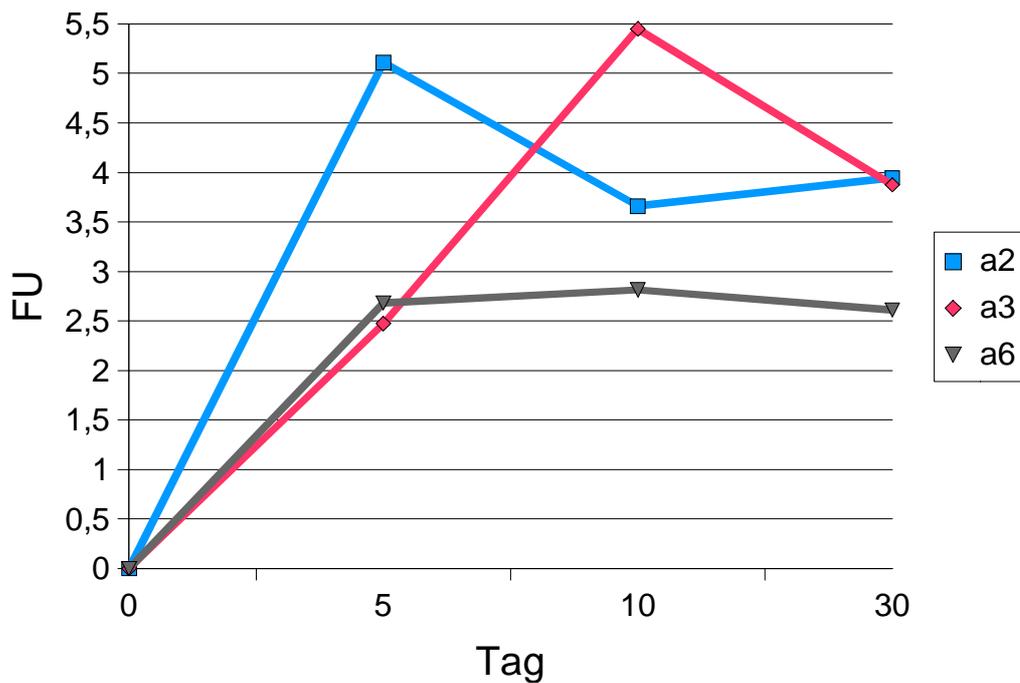


Abbildung 54: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=27%

### **3.4.4.2 Stimulation mit PGE2**

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten unter Stimulation mit PGE2 einen protrahierten Anstieg bis zum 10. Versuchstag. Hierbei wies Integrin  $\alpha 1$  eine Erhöhung der Meßwerte um ca. 17% gegenüber den Meßwerten, die an PGE2-stimulierten Hepatozyten auf einer basalen Collagen-I-Schicht erhoben wurden (C/0), auf. Integrin  $\alpha 5$  hingegen zeigte keine Abhängigkeit von einer Collagen-I-Zugabe zum Kulturmedium. Die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  ließen sich ebenfalls nicht durch Zugabe von Collagen-I beeinflussen. Im Vergleich mit nicht-stimulierten Kontroll-Hepatozyten (s. 3.4.4.1) ließ sich kein signifikanter Anstieg der Meßwerte unter PGE2-Stimulation erheben. (Abb. 55, 56)

## Integrine - Collagen I + Matrigel

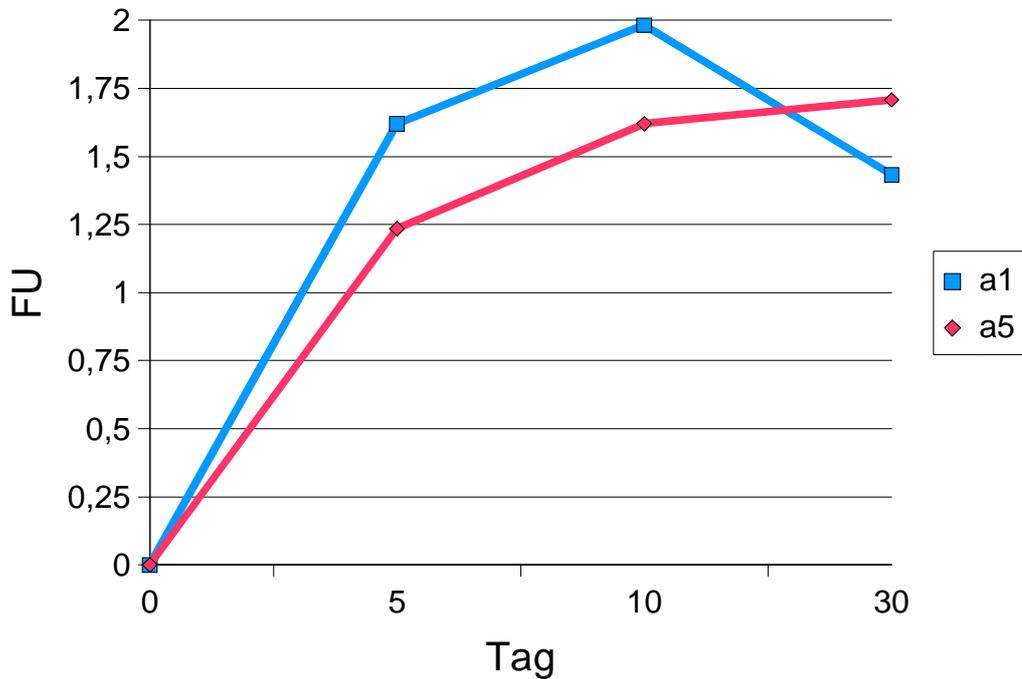


Abbildung 55: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=33%

## Integrine - Collagen I - Matrigel

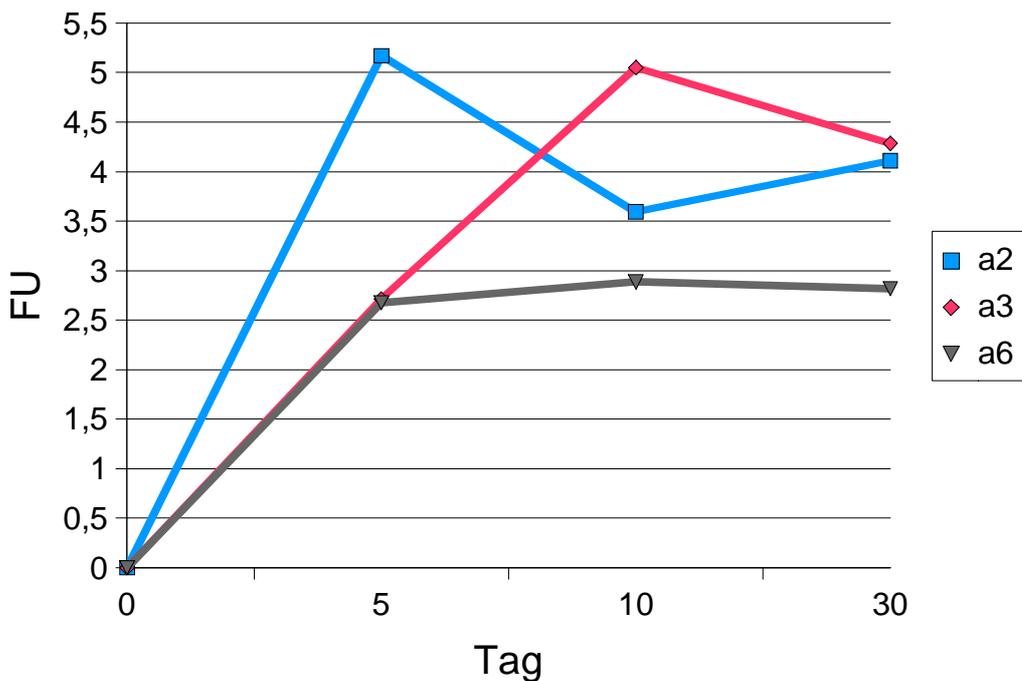


Abbildung 56: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

### **3.4.4.3 Stimulation mit PMA**

Nach Stimulation mit PMA stiegen die Meßwerte für die Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  gegenüber den unstimulierten Kontrollen um 30% an. Desgleichen ließ sich eine leicht vermehrte Expression von Integrin  $\alpha 5$  um 20% nachweisen, während die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 6$  keine signifikante Änderung gegenüber unstimulierten Kontrollwerten aufwiesen.

Im Vergleich zwischen Hepatozyten, die im Sandwich-Ansatz zwischen Collagen-I und flüssigem Matrigel im Überstand kultiviert worden waren (C/M), und Hepatozyten, die in „single gel technique“ auf einem Collagen-I-Gel ausgesät wurden (C/0), ließen sich keine statistisch signifikanten Veränderungen nachweisen. (Abb. 57, 58)

## Integrine - Collagen I + Matrigel

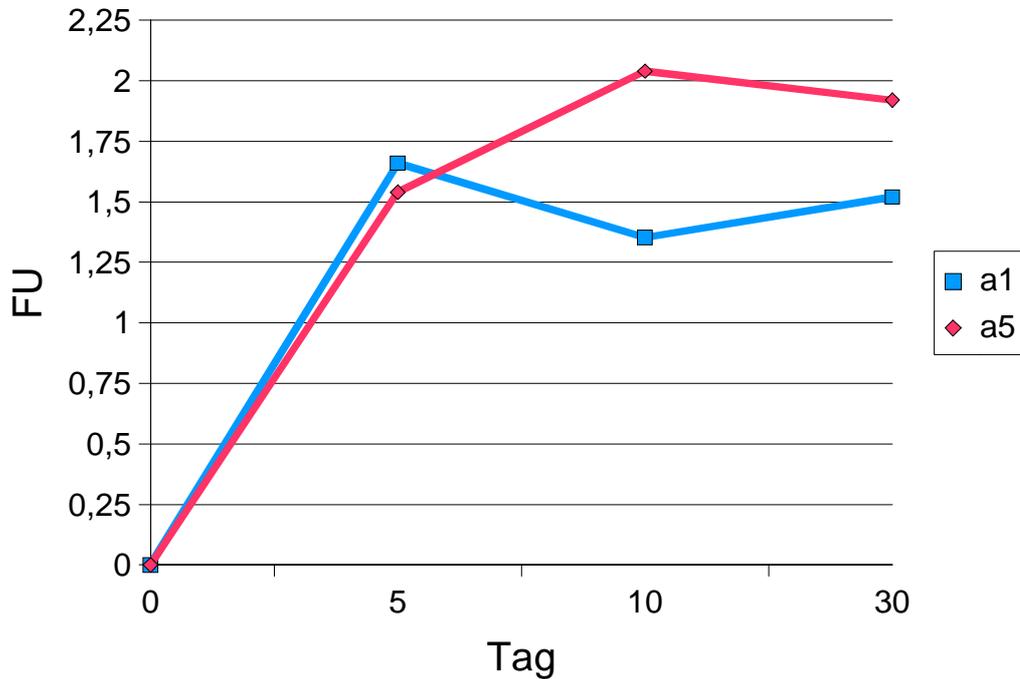


Abbildung 57: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=32%

## Integrine - Collagen I + Matrigel

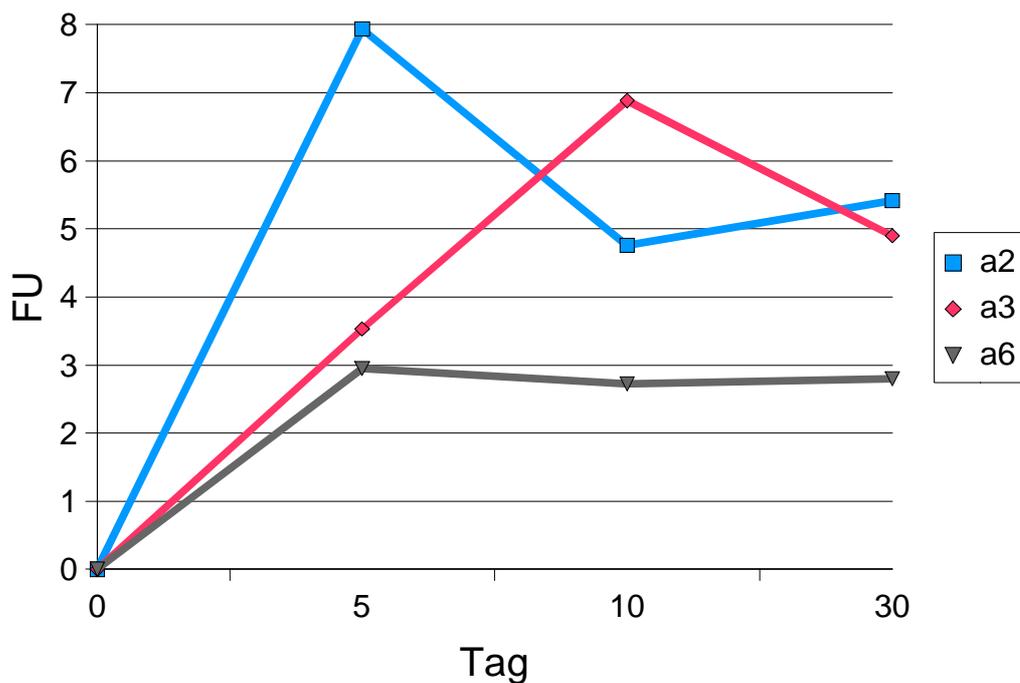


Abbildung 58: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=34%

#### **3.4.4.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$**

Sowohl die Expression von ICAM-1 und MHC-I ließ sich durch IL-1 resp. IFN- $\gamma$  stimulieren. Im Vergleich zwischen dem Collagen-Matrigel-Sandwich-Ansatz (C/M) und dem „single-gel“-Ansatz Collagen-I (C/0) ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied nachweisen.

Im Vergleich zwischen IL-1-stimuliertem ICAM-1 respektive IFN- $\gamma$ -stimuliertem MHC-I und MHC-II ließ sich eine vermehrte Expression von MHC-I und MHC-II auf das Doppelte der unstimulierten Werte nachweisen. ICAM-1 hingegen ließ sich nicht durch IL-1 stimulieren. (Abb. 59)

## ICAM-I / MHC I+II

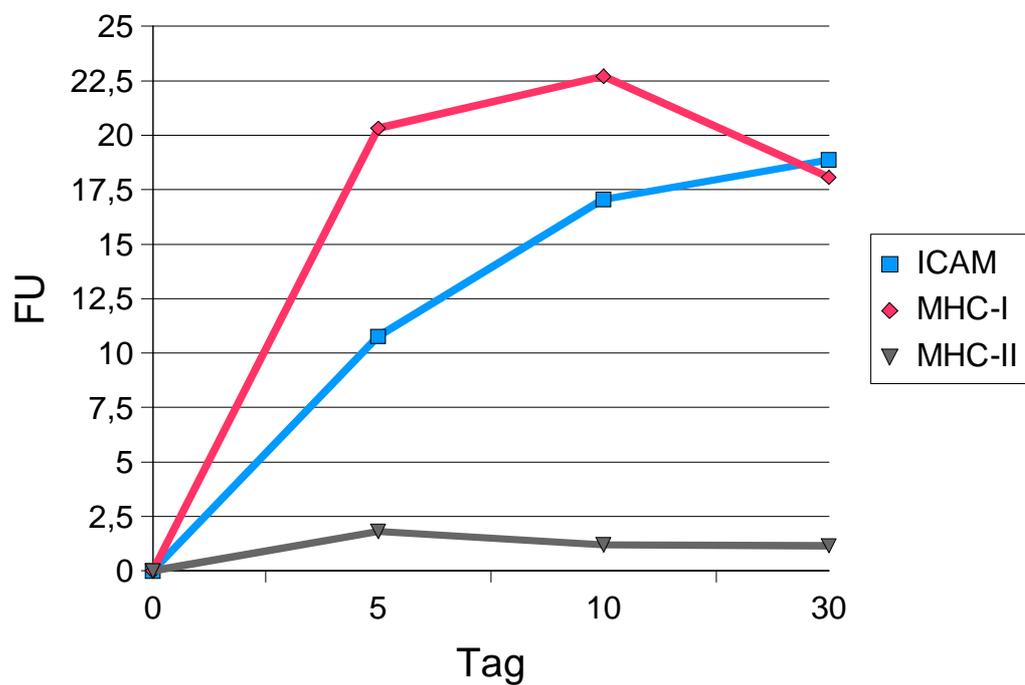


Abbildung 59: Nachweis des zeitlichen Verlaufes von ICAM-1 und MHC-I u. II auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit IL-1 (ICAM-1) resp. IFN- $\gamma$  (MHC-I+II). Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=29%

### **3.4.5 Hepatozyten auf einer Matrigel-Matrix unter dem Einfluß eines mit Matrigel angereicherten Kulturmediums (M/M)**

#### **3.4.5.1 Nichtstimulierte Hepatozyten**

Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  zeigten einen maximalen Anstieg bis zum 5. Versuchstag, danach kam es zu einem geringgradigen Abfallen der Meßwerte. Die Kurve für Integrin  $\alpha 5$  zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Meßwerte über die Versuchsdauer. Integrin  $\alpha 6$  wies ab dem 5. Versuchstag einen kontinuierlichen Verlauf auf.

Im Vergleich der Expression der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  auf einer basalen Matrigel-Matrix (M/0) mit Hepatozyten auf einer basalen Matrigel-Matrix und Matrigel im Kulturmedium (M/M) ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied durch eine Zugabe von Matrigel zum Kulturmedium ermitteln. (Abb. 60, 61)

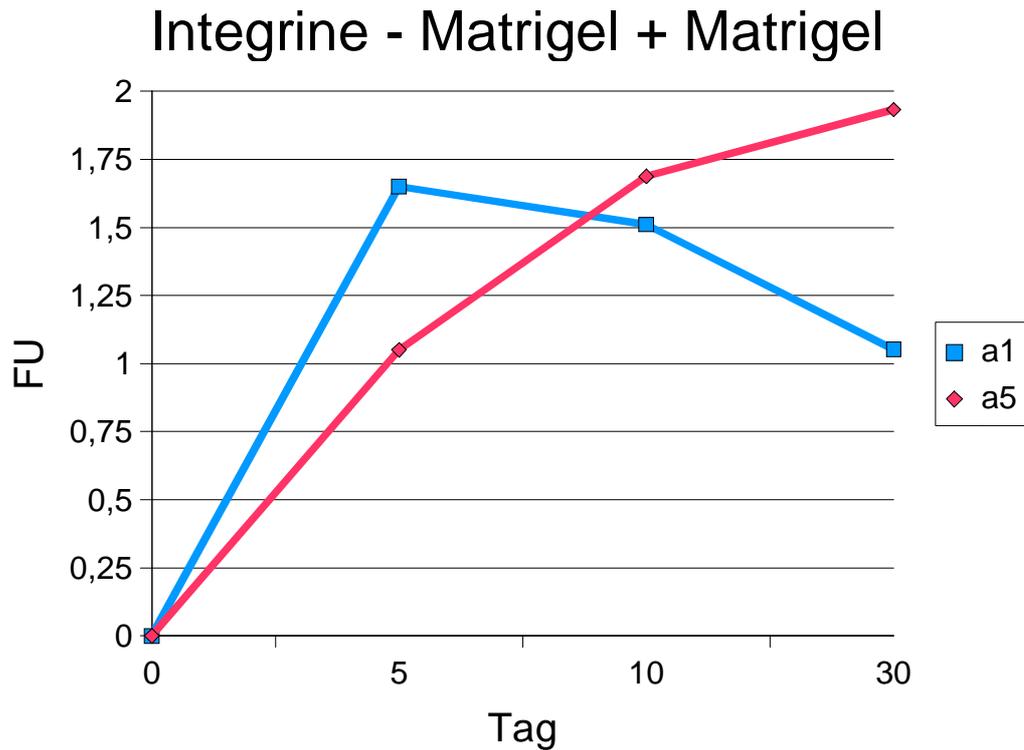


Abbildung 60: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

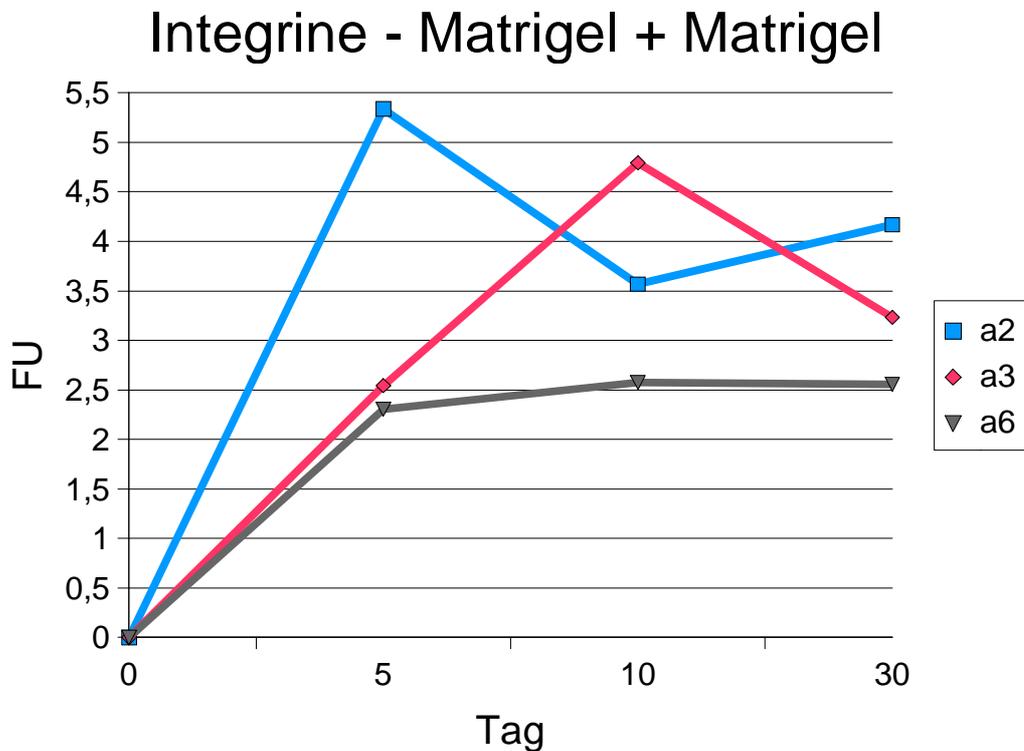


Abbildung 61: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

### **3.4.5.2 Stimulation mit PGE 2**

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten unter Stimulation mit PGE2 einen unveränderten Verlauf wie die unstimulierten Kontrollen.

Im Vergleich mit unstimulierten Kontrollhepatozyten änderte sich die Expression der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht durch Stimulation mit PGE2. Auch im Vergleich mit Hepatozyten, die im zweidimensionalen Ansatz auf Matrigel kultiviert worden waren (M/0), konnte durch eine Zugabe von Matrigel zum Kulturmedium keine Änderung der Expression der Integrin-Rezeptoren nachgewiesen werden. (Abb. 62, 63)

## Integrine - Matrigel + Matrigel

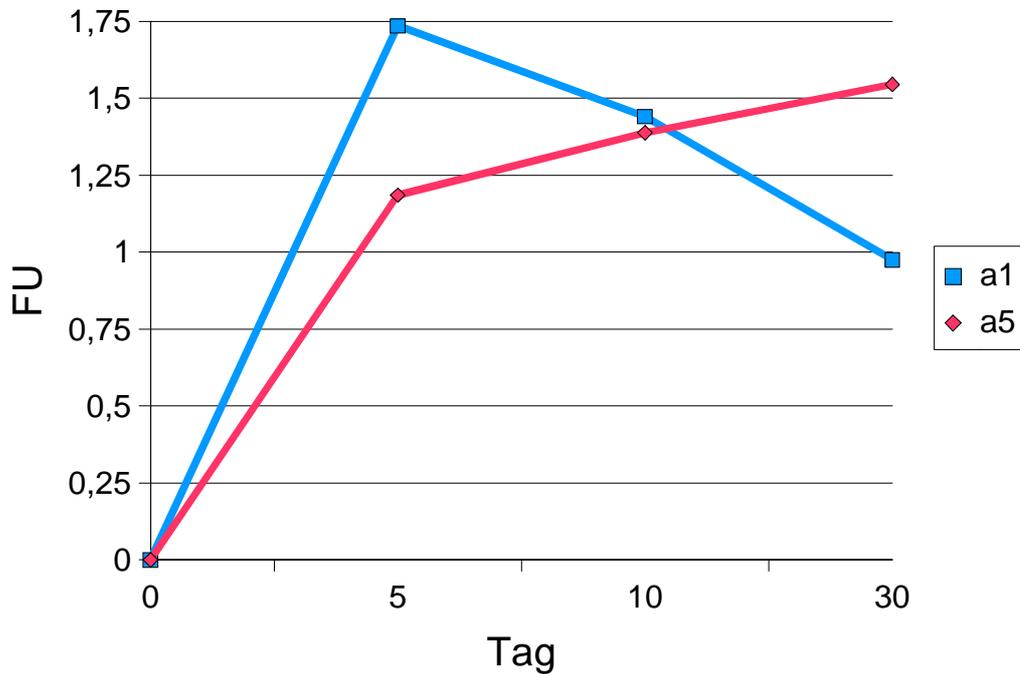


Abbildung 62: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=34%

## Integrine - Matrigel + Matrigel

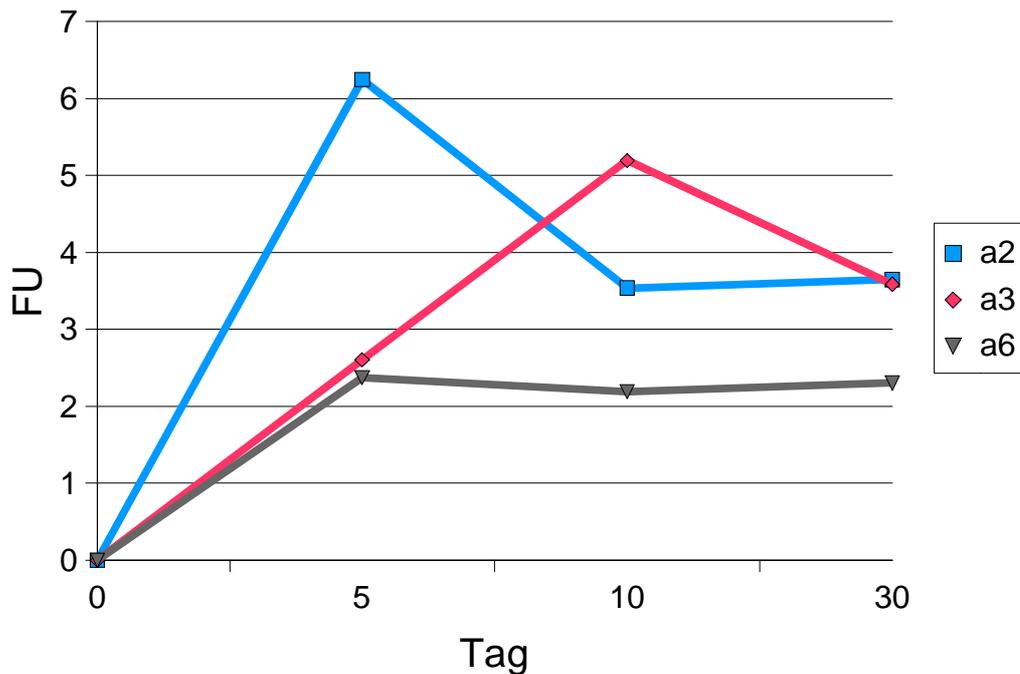


Abbildung 63: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=33%

### 3.4.5.3 Stimulation mit PMA

Die Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  zeigten nach Stimulation mit PMA eine Vermehrung der Expression gegenüber den unstimulierten Kontrollen, am deutlichsten stieg die Expression von Integrin  $\alpha 2$  um 54% an. Die Expression von Integrin  $\alpha 3$  ließ sich durch Zugabe von PMA um etwa 41% steigern, während Integrin  $\alpha 1$  nur einen Anstieg der Expression um 22% aufwies. Die Integrine  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  hingegen ließen sich durch eine Zugabe von PMA nicht stimulieren.

Nach Zugabe von Matrigel zum Kulturmedium ließ sich keine signifikante Veränderung der Expression der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  gegenüber dem zweidimensionalen Matrigel-Ansatz (M/0) nachweisen. (Abb. 64, 65)

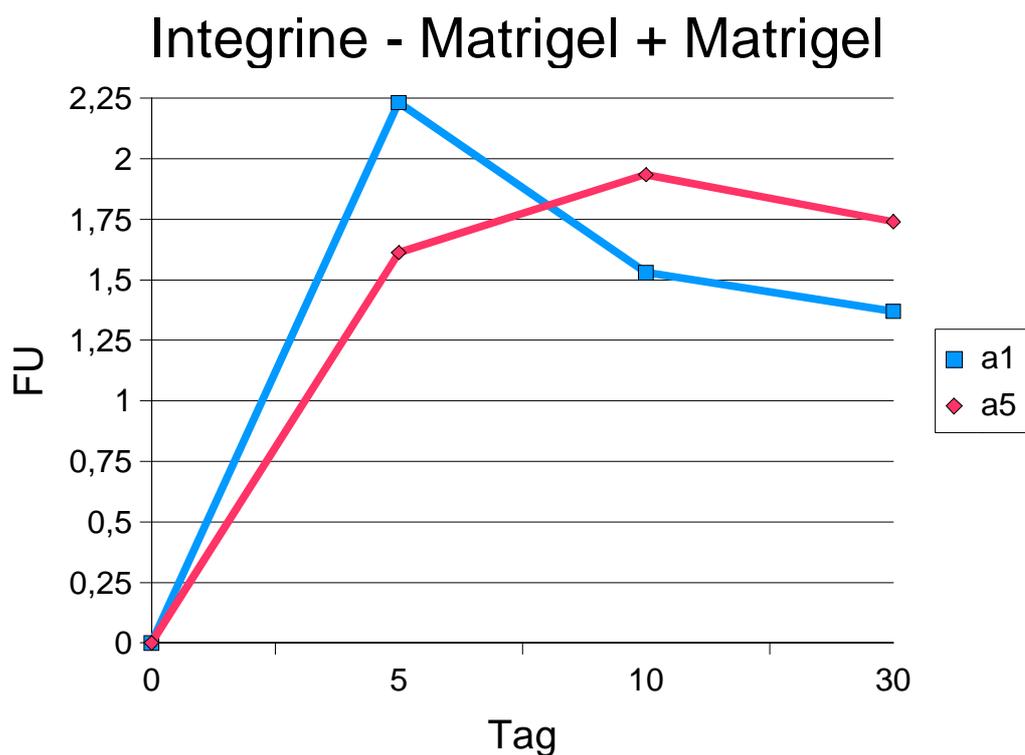


Abbildung 64: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=31%

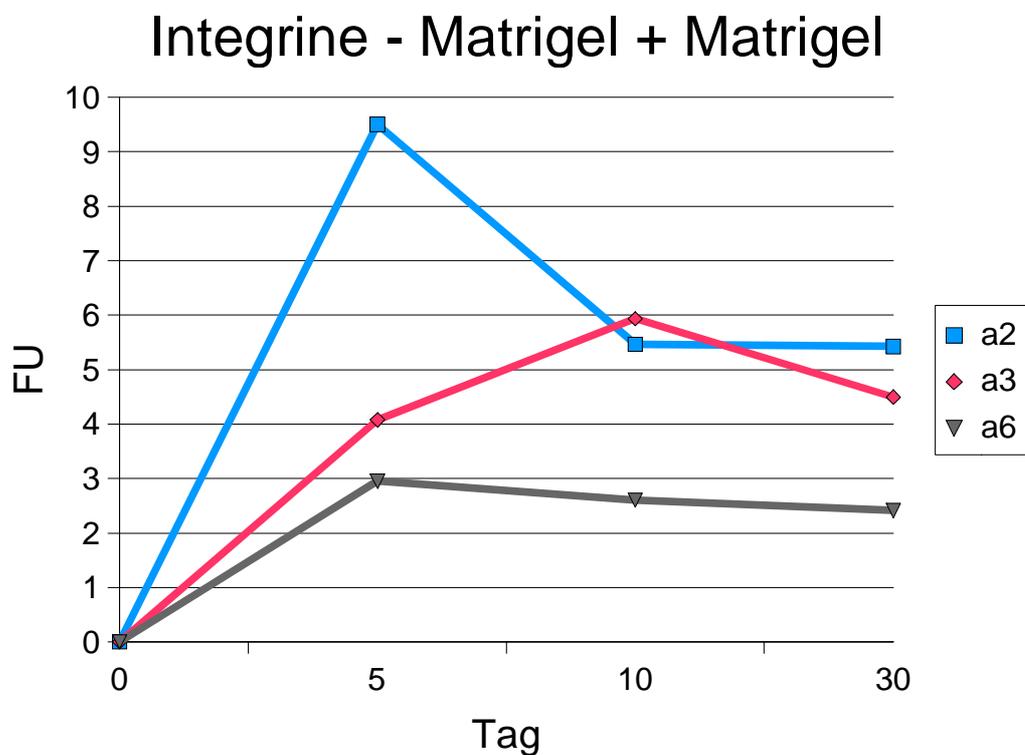


Abbildung 65: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=25%

#### **3.4.5.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$**

Die Expression von ICAM-I sowie die Expression von MHC-I und MHC-II ließen sich durch Zugabe von IL-1 respektive IFN- $\gamma$  steigern. Unter Zugabe von IL-1 kam es zu einer Steigerung der Expression von ICAM-I um 38%, unter Hinzufügen von IFN- $\gamma$  zu einer Vermehrung des Rezeptors MHC-I um 138% respektive 230% bei MHC-II. Im Vergleich mit dem zweidimensionalen Matrigel-Ansatz (M/0) kam es hingegen nur zu einer Vermehrung der Expression von ICAM-I um 20%, die Meßwerte für MHC-I und MHC-II fielen um ca. 7% ab. (Abb. 66)

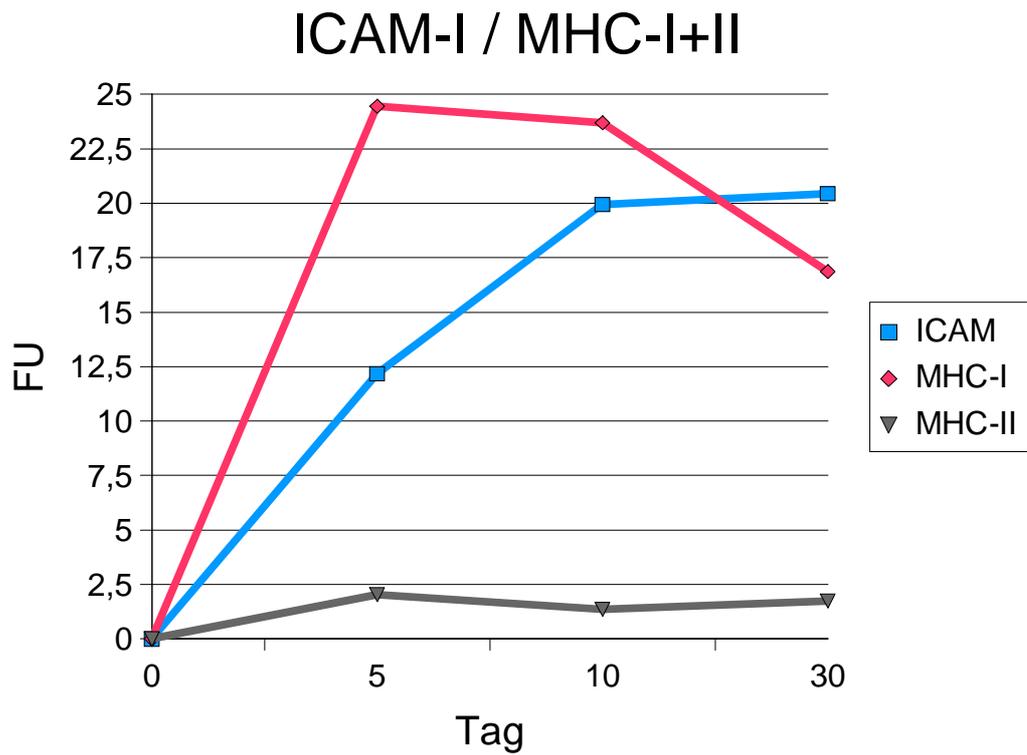


Abbildung 66: Nachweis des zeitlichen Verlaufes von ICAM-1 und MHC-I u. II auf einer Matrigel-Matrix unter Stimulation mit IL-1 (ICAM-1) resp. IFN- $\gamma$  (MHC-I+II). Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Matrigel angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=33%

### **3.4.6 Hepatozyten auf einer Collagen-I-Matrix unter dem Einfluß eines mit Collagen-I angereicherten Kulturmediums (C/C)**

#### **3.4.6.1 Nichtstimulierte Hepatozyten**

Die Meßwerte für Integrin  $\alpha 1$  zeigten einen maximalen Anstieg bis zum 5. Versuchstag, danach kam es zu einem deutlichen Abfallen der Meßwerte zum Versuchstag 20. Nachfolgend kam es zu einem Wiederanstieg der Meßwerte bis zum Versuchstag 30. Die Kurve für Integrin  $\alpha 5$  wies einen ähnlichen Verlauf auf.

Integrin  $\alpha 2$  zeigte einen maximalen Meßwert am 5. Versuchstag, ein darauffolgendes Absinken der Meßwerte sowie einen sich daran anschließenden Wiederanstieg. Integrin  $\alpha 3$  zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der Meßwerte.

Im Vergleich der Meßwerte zwischen dem dreidimensionalen Collagen-I-Ansatz mit Collagen-I-Zusatz zum Kulturmedium (C/C) und dem zweidimensionalen Kollagen-Ansatz auf einer basalen Collagen-I-Matrix (C/0) ließ sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Expression der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  nachweisen. (Abb. 67, 68)

## Integrine - Collagen I + Collagen I

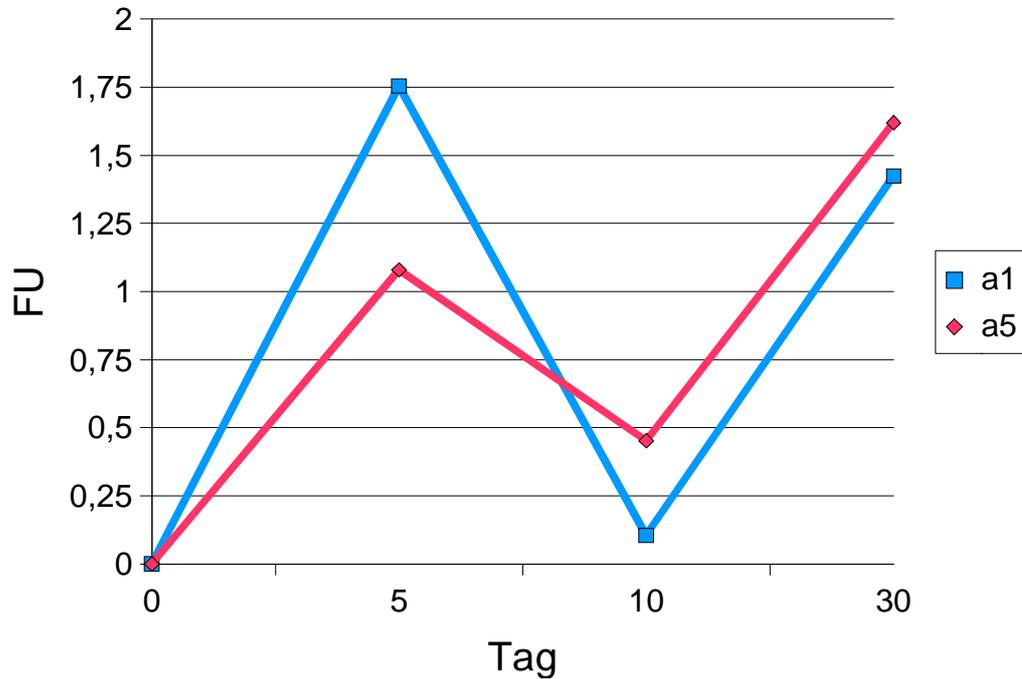


Abbildung 67: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=24%

## Integrine - Collagen I + Collagen I

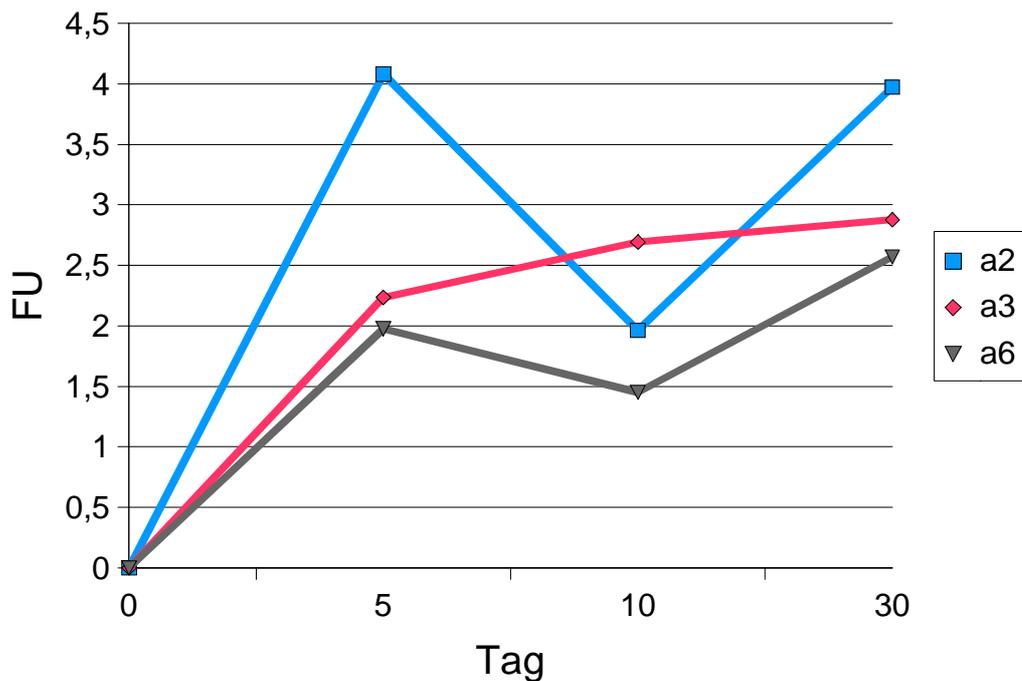


Abbildung 68: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=26%

### **3.4.6.2 Stimulation mit PGE 2**

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten unter Stimulation mit PGE2 einen Anstieg bis zum 5. resp. 10. Versuchstag, der sich jedoch vom Anstieg der unstimulierten Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht signifikant unterschied.

Auch die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  wiesen nach Stimulation mit PGE2 keinen signifikanten Unterschied gegenüber den unstimulierten Kontrollen auf.

Im Vergleich zwischen dem dreidimensionalen Collagen-Ansatz mit Collagen-I-Zusatz zum Kulturmedium (C/C) und dem zweidimensionalen Collagen-Ansatz (C/0) ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  nicht nachweisen. (Abb. 69, 70)

## Integrine - Collagen I + Collagen I

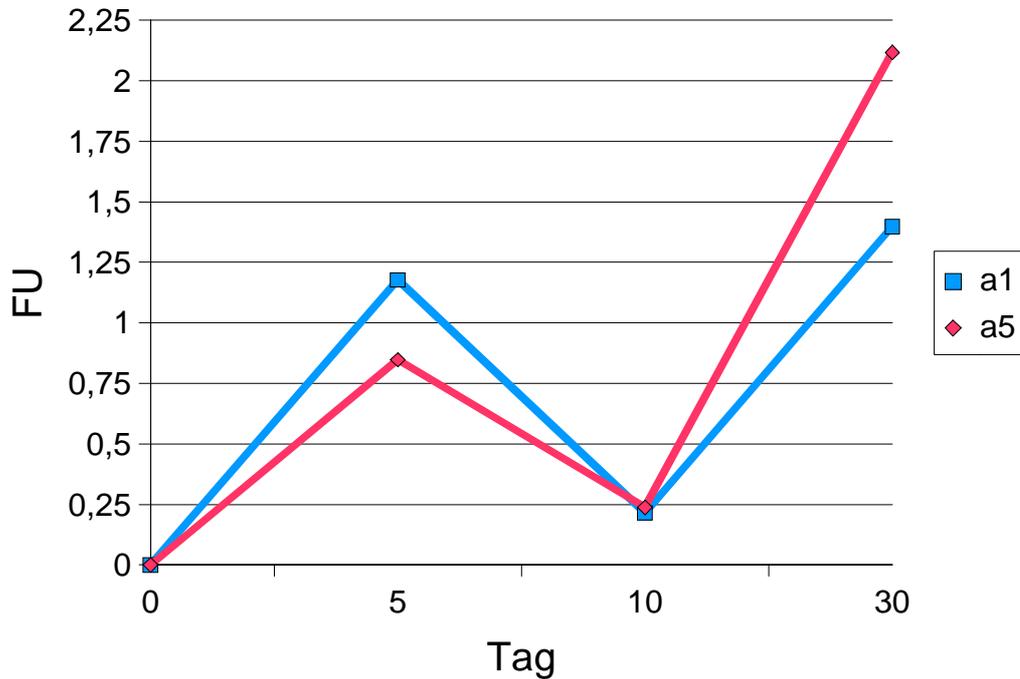


Abbildung 69: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=35%

## Integrine - Collagen I + Collagen I

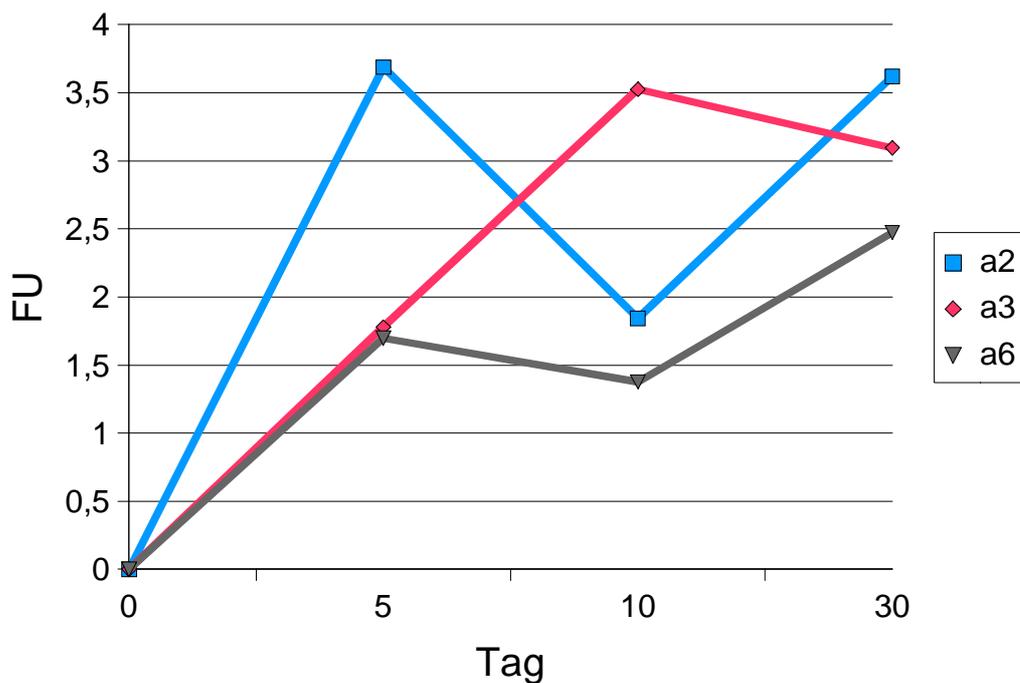


Abbildung 70: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PGE2. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Ergebnisse aus 3 Experimenten. Mittlere SD=31%

### 3.4.6.3 Stimulation mit PMA

Die Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  zeigten unter Stimulation mit PMA einen Anstieg der Meßwerte zum 5. Versuchstag, der sich jedoch vom Anstieg der unstimulierten Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  nicht signifikant unterschied.

Integrin  $\alpha 2$  zeigte einen maximalen Meßwert am 5. Versuchstag, einen darauffolgenden Abfall zum 20. Versuchstag und einen Wiederanstieg zum 30. Versuchstag. Integrin  $\alpha 3$  wies einen maximalen Meßwert am 20. Versuchstag auf.

Im Vergleich der Meßwerte des dreidimensionalen Collagen-Ansatzes mit Collagen-I-Zusatz zum Kulturmedium (C/C) waren diese Meßwerte um ca. 30% gegenüber den im zweidimensionalen Collagen-I-Ansatz erhobenen Meßwerten (C/0) vermindert. (Abb. 71, 72)

## Integrine - Collagen I + Collagen I

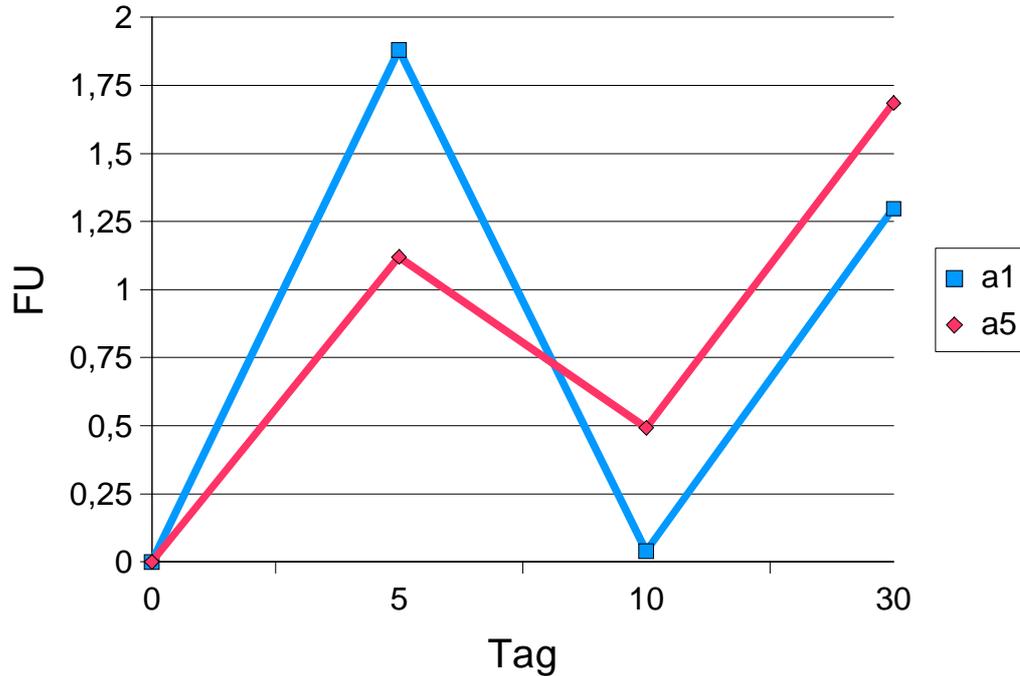


Abbildung 71: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 5$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=25%

## Integrine - Collagen I + Collagen I

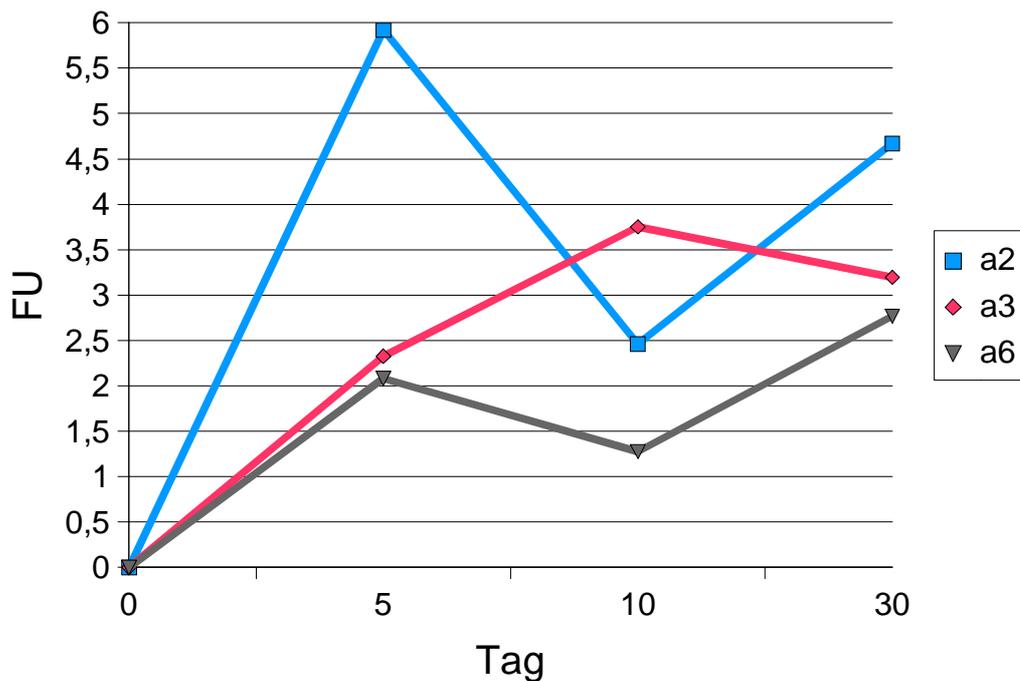


Abbildung 72: Nachweis des zeitlichen Verlaufes der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  auf einer Collagen-I-Matrix unter Stimulation mit PMA. Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=33%

#### **3.4.6.4 Stimulation mit IL-1 resp. IFN- $\gamma$**

Sowohl die Expression von ICAM und MHC-I ließ sich durch IL-1 resp. IFN- $\gamma$  stimulieren, hierbei ließ sich die Expression von MHC-I durch IFN- $\gamma$  um 220% steigern. Die Expression von ICAM-I hingegen ließ sich nur um 15% steigern. MHC-II zeigte keine signifikante Änderung der Meßwerte durch eine Stimulation mit IFN- $\gamma$ . Im Vergleich der Meßwerte zwischen dem dreidimensionalen Collagen-I-System (C/C) und dem zweidimensionalen Collagen-I-System (C/0) zeigte sich eine Verminderung der Expression von ICAM-I, MHC-I und MHC-II um 25%. (Abb. 73)

## ICAM-I / MHC-I+II

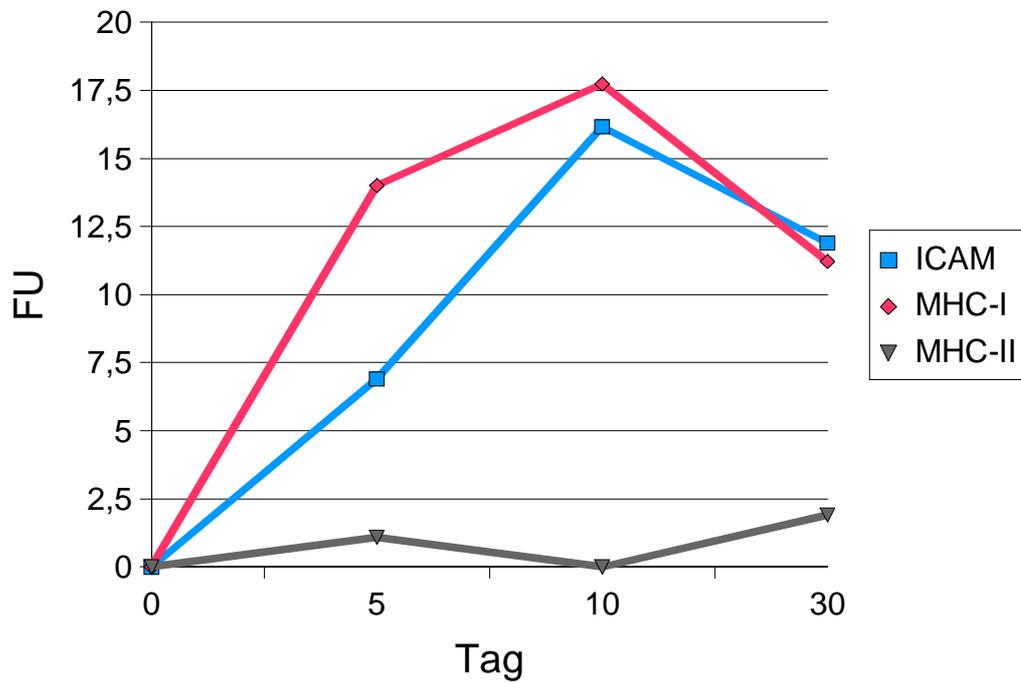


Abbildung 73: Nachweis des zeitlichen Verlaufes von ICAM-1 und MHC-I u. II auf einer Collagen-1-Matrix unter Stimulation mit IL-1 (ICAM-1) resp. IFN- $\gamma$  (MHC-I+II). Das Kulturmedium wurde mit flüssigem Collagen-I angereichert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 Experimenten. Mittlere SD=30%

## Vergleich Zytokeratin 8 2D vs. 3D

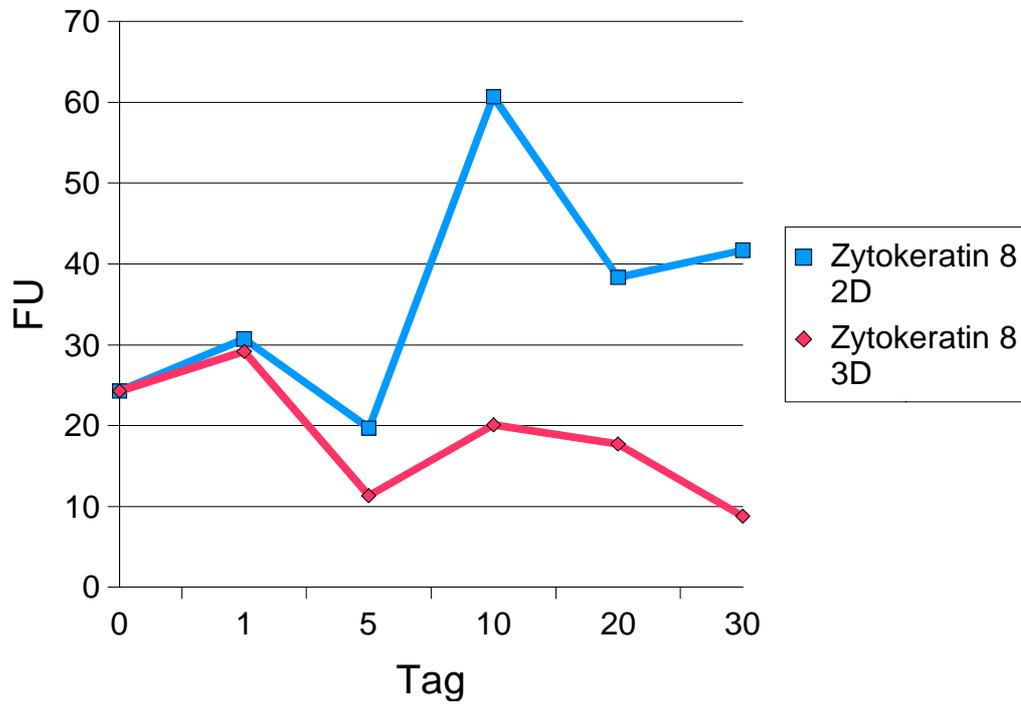


Abbildung 74: Vergleich des Zytokeratins 8 zwischen einer zweidimensionalen Matrigel- und einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix. Mittlere SD=33%

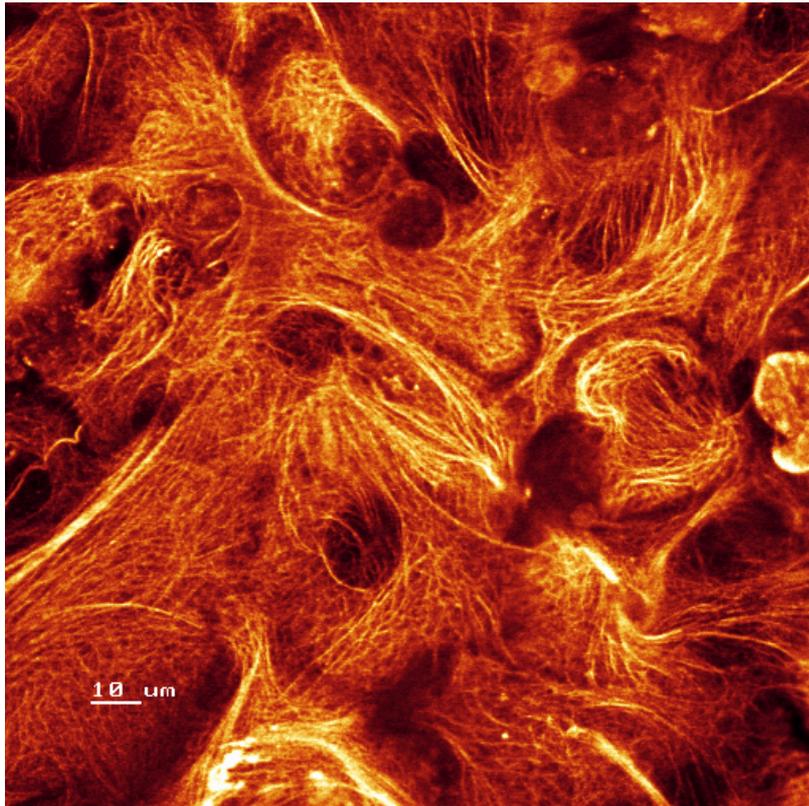


Abbildung 75: Zytokeratin 8 in einem dreidimensionalen Kollagen-Modell. Polymorphe Form der Hepatozyten, regelrechtes Zytokeratinmuster.

## Vergleich Zytokeratin 19 2D vs. 3D

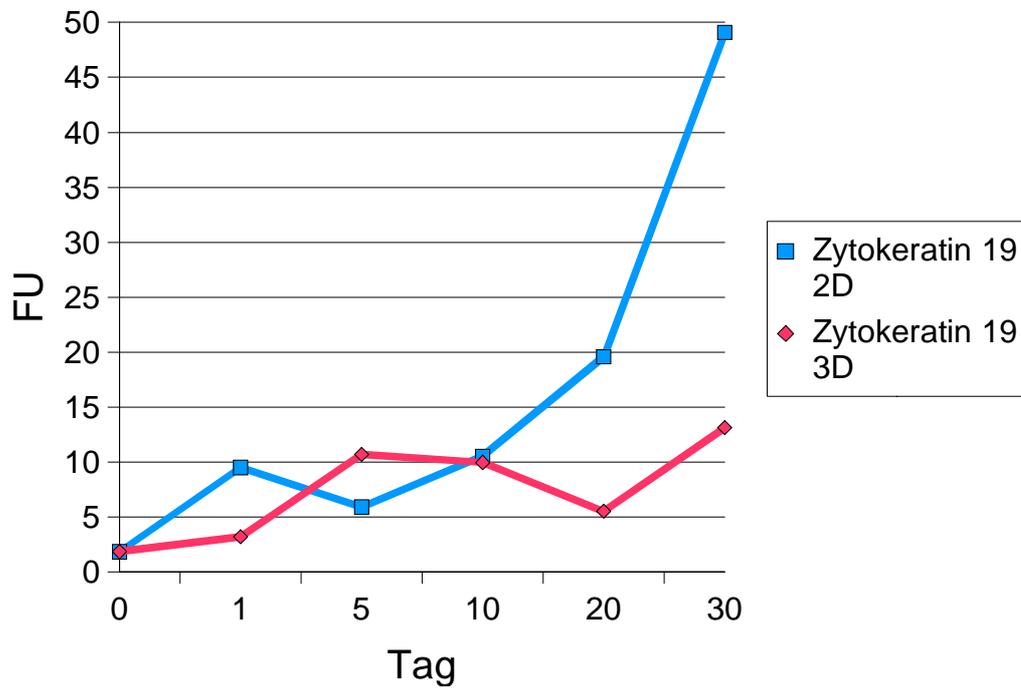
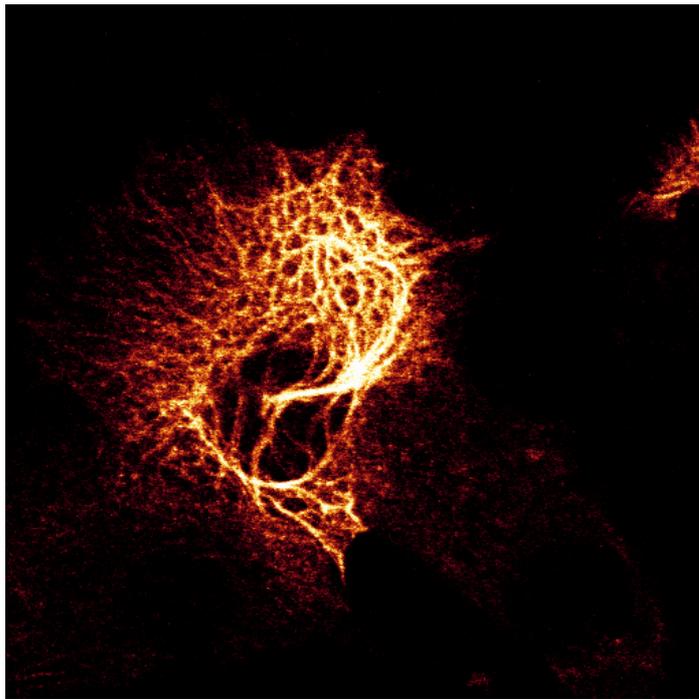


Abbildung 76: Vergleich des Zytokeratins 19 zwischen einer zweidimensionalen Matrigel- und einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix. Mittlere SD=31%



*Abbildung 77: Zytokeratin 19 im zweidimensionalen Matrigel-System. Deutliche Expression von Zytokeratin 19.*

## Vergleich 2D vs. 3D im Western Blot

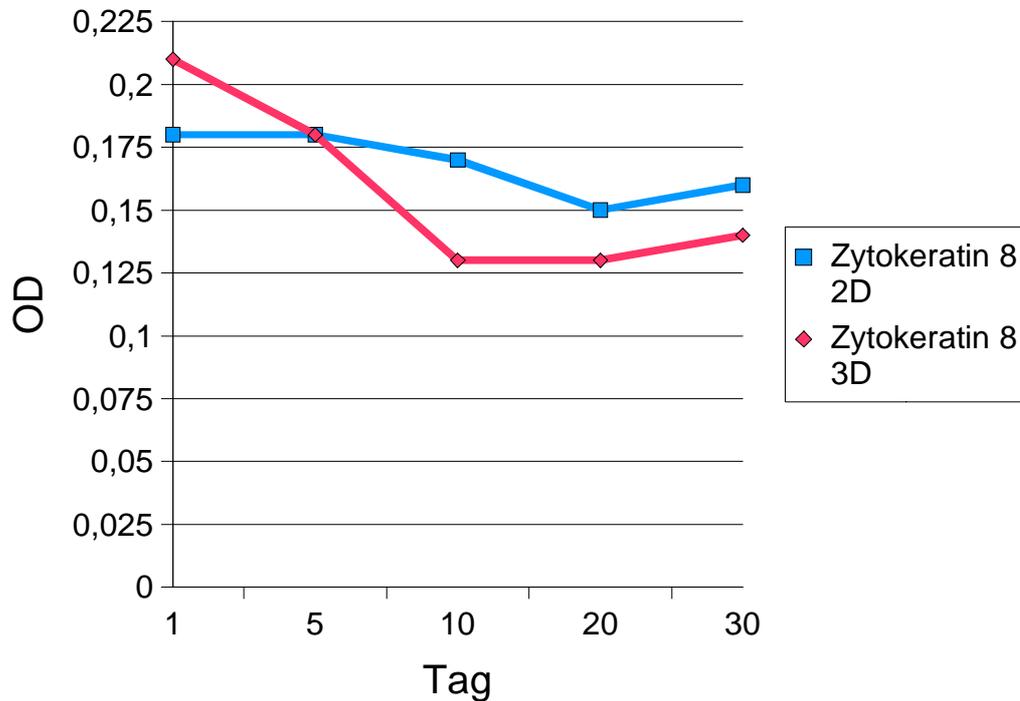


Abbildung 78: Vergleich des Zytokeratins 8 zwischen einer zweidimensionalen Matrigel- und einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix. Western Blot. Mittlere SD=15%

## Vergleich 2D vs. 3D im Western Blot

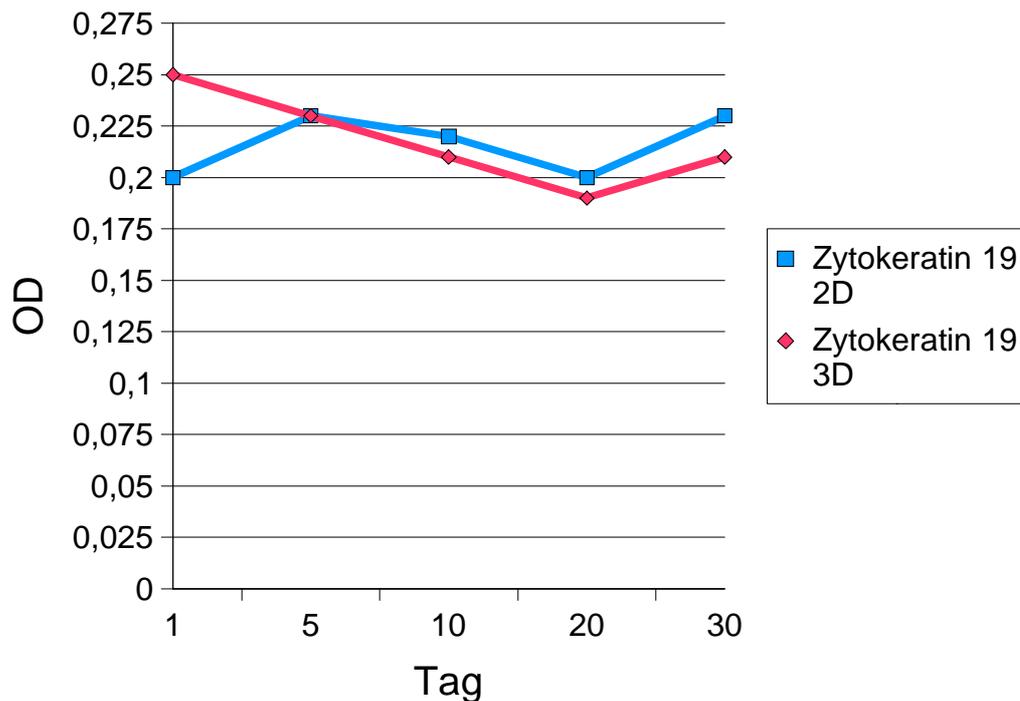


Abbildung 79: Vergleich des Zytokeratins 19 zwischen einer zweidimensionalen Matrigel- und einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix. Western Blot. Mittlere SD=35%

## Vergleich Integrin $\alpha 2$ 2D vs. 3D

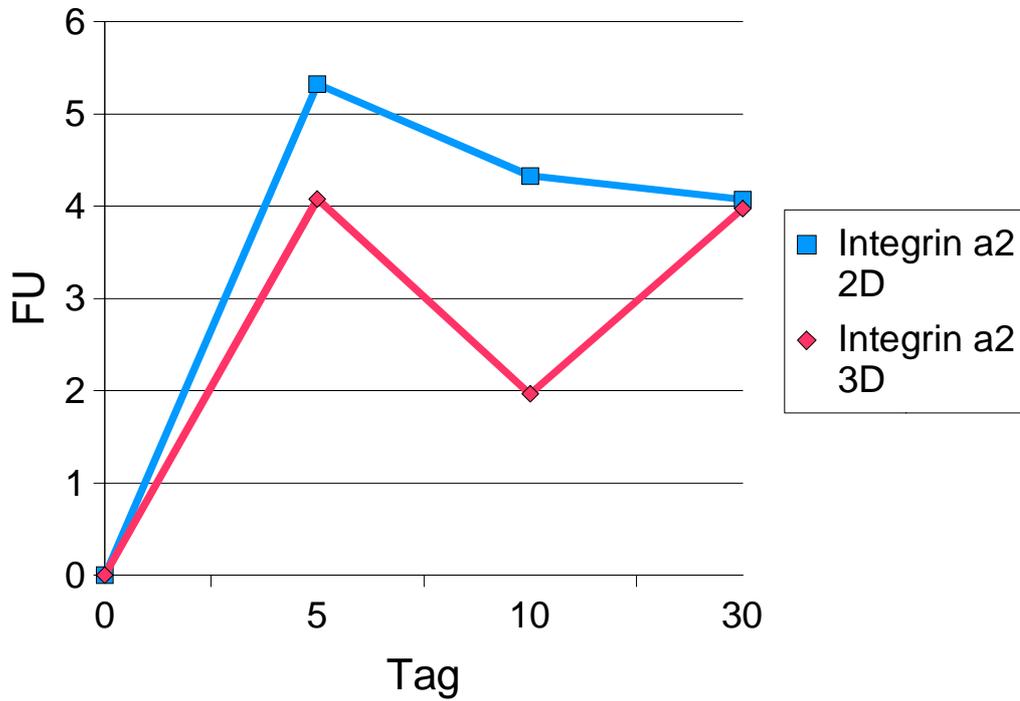


Abbildung 80: Integrin  $\alpha 2$  auf einer zweidimensionalen Matrigel und einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix. Mittlere SD=23%

## Vergleich Integrin $\alpha 3$ 2D vs. 3D

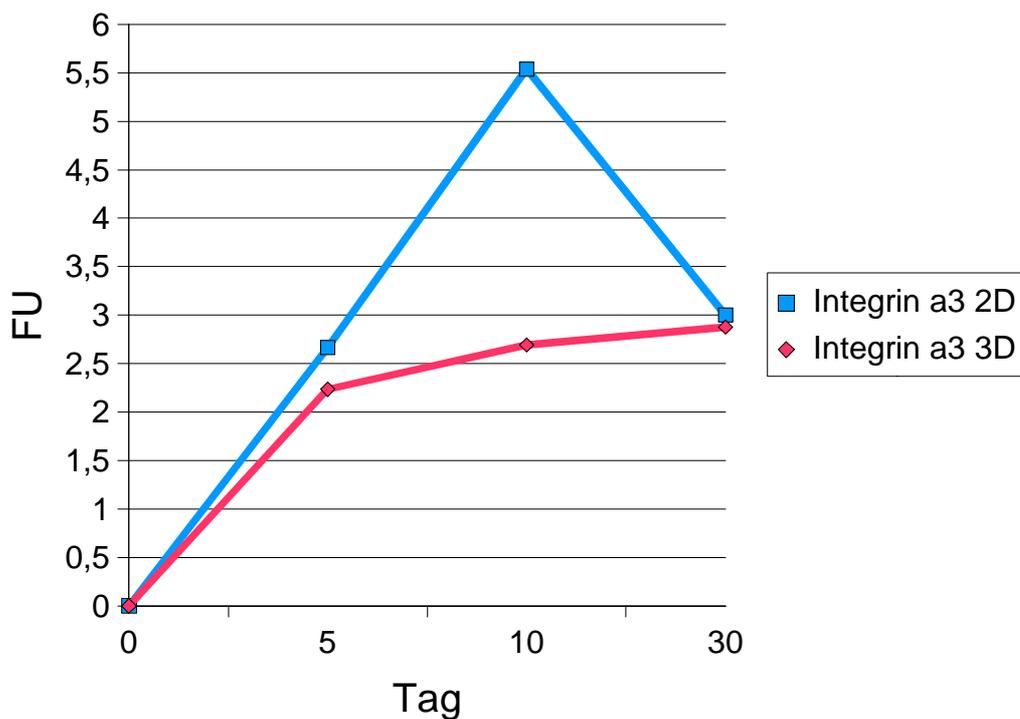
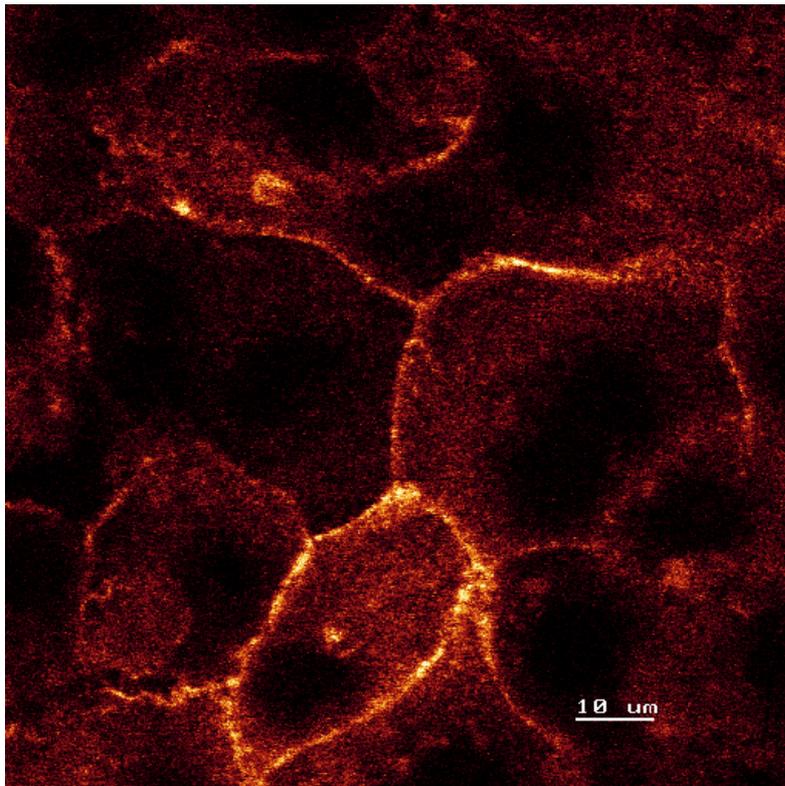


Abbildung 81: Integrin  $\alpha 3$  auf einer zweidimensionalen Matrigel und einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix. Mittlere SD=26%



*Abbildung 82: Integrin  $\alpha 2$  auf einer zweidimensionalen Matrigel-Matrix. Deutliche Expression eines unphysiologischen Integrins*

## Integrine - a1 vs. a2

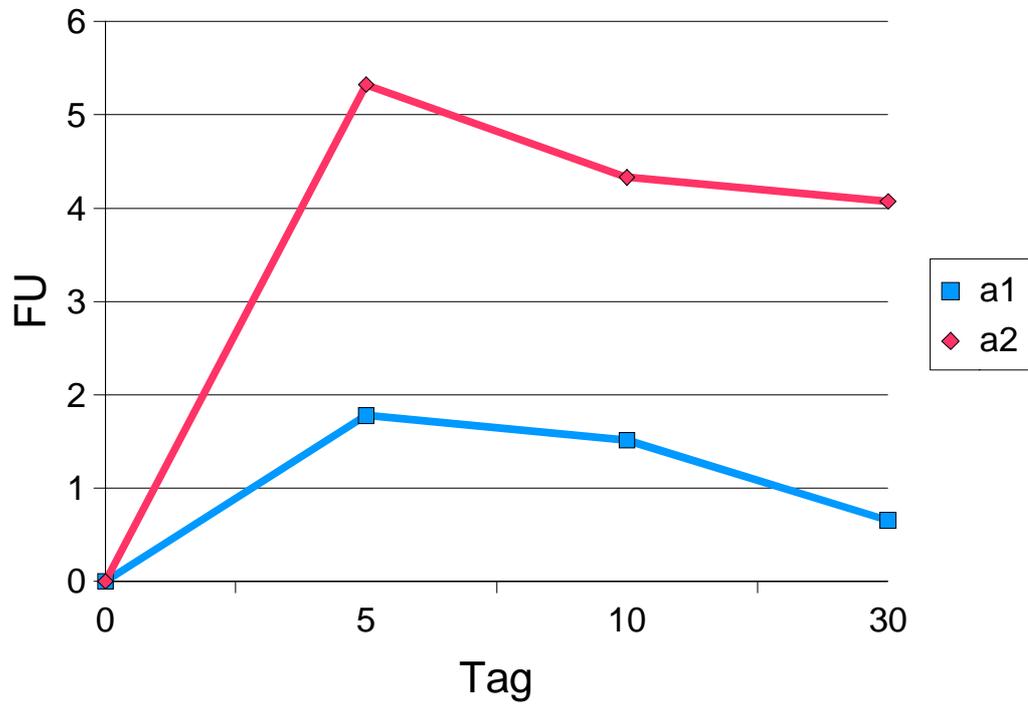


Abbildung 83: Vergleich des physiologisch exprimierten Integrins  $\alpha 1$  gegenüber dem nicht-physiologisch exprimierten Integrin  $\alpha 2$  auf einer zweidimensionalen Matrigel-Matrix. Mittlere  $SD=34\%$

## Integrine - a1 vs. a2

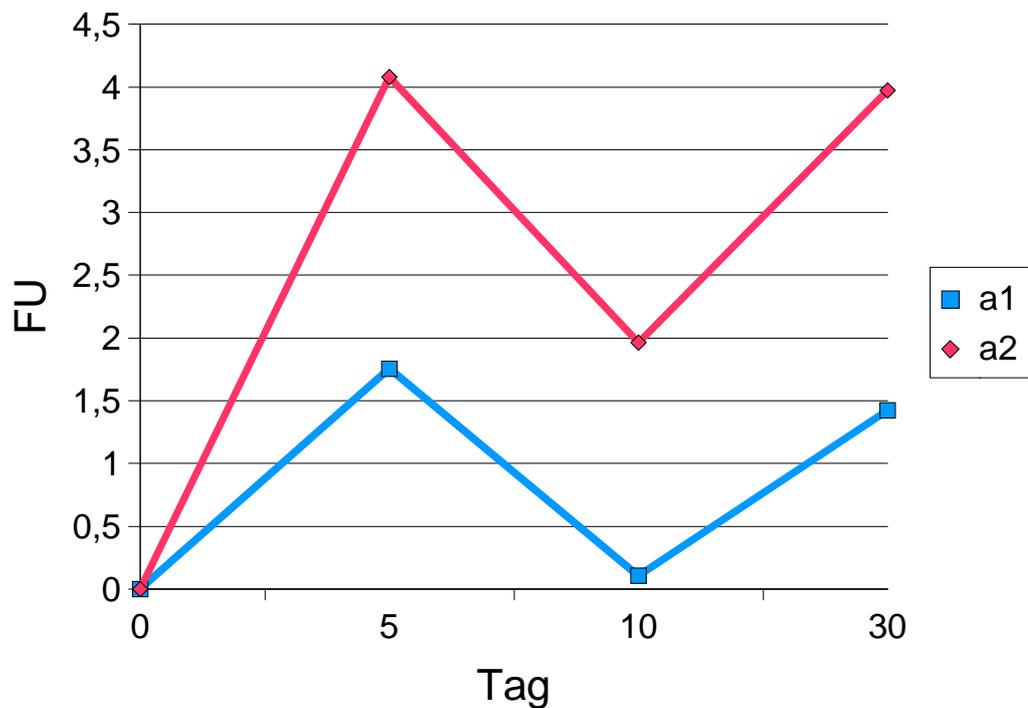


Abbildung 84: Vergleich des physiologisch exprimierten Integrins  $\alpha 1$  gegenüber dem nicht-physiologisch exprimierten Integrin  $\alpha 2$  auf einer dreidimensionalen Collagen-Matrix. Mittlere  $SD=33\%$

## Stimuliertes vs. unstimuliertes Integrin $\alpha 1$

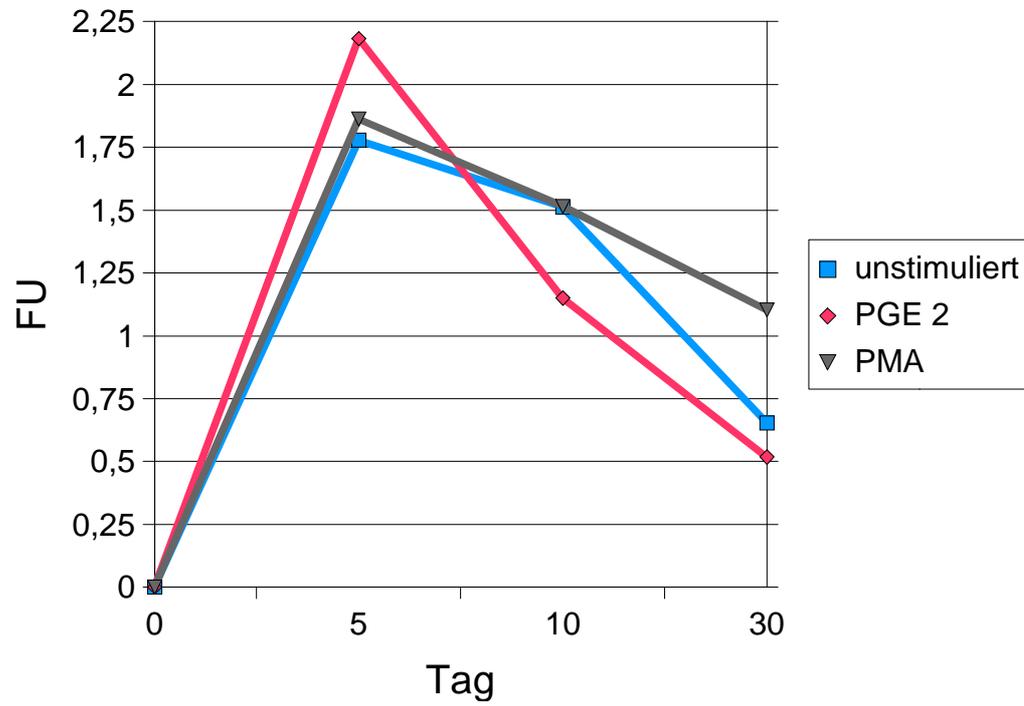


Abbildung 85: Vergleich stimulierten gegen unstimuliertes Integrin  $\alpha 1$ . Mittlere SD=32%

## Stimuliertes vs unstimuliertes Integrin $\alpha 2$

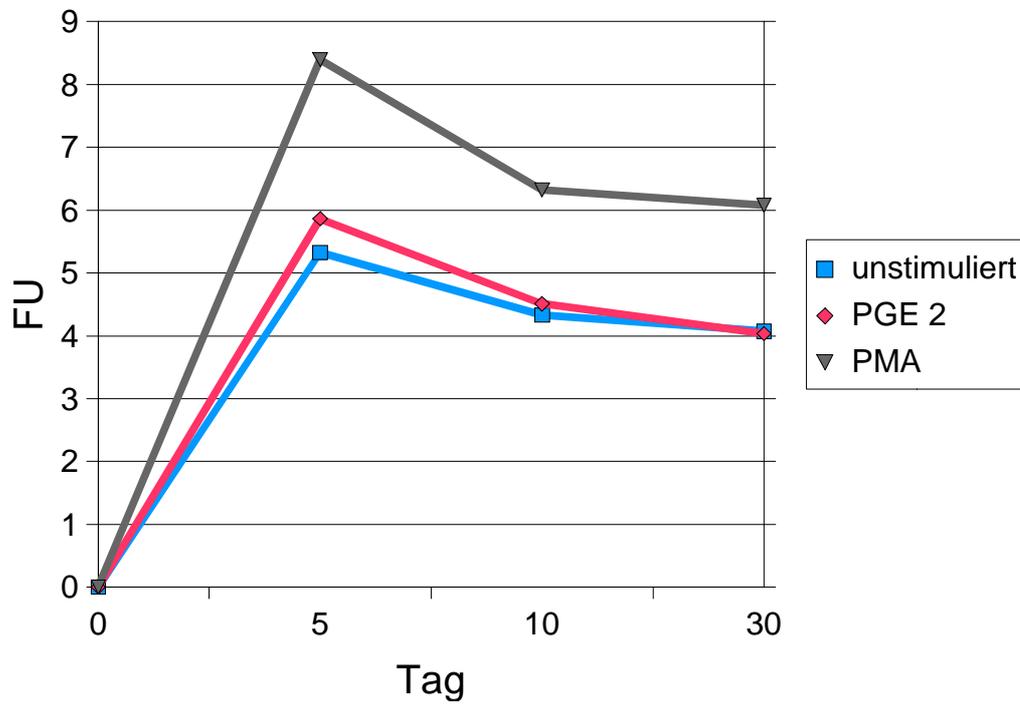


Abbildung 86: Vergleich stimulierten gegen unstimuliertes Integrin  $\alpha 2$ . Mittlere SD=28%

## Stimuliertes vs unstimuliertes Integrin $\alpha 3$

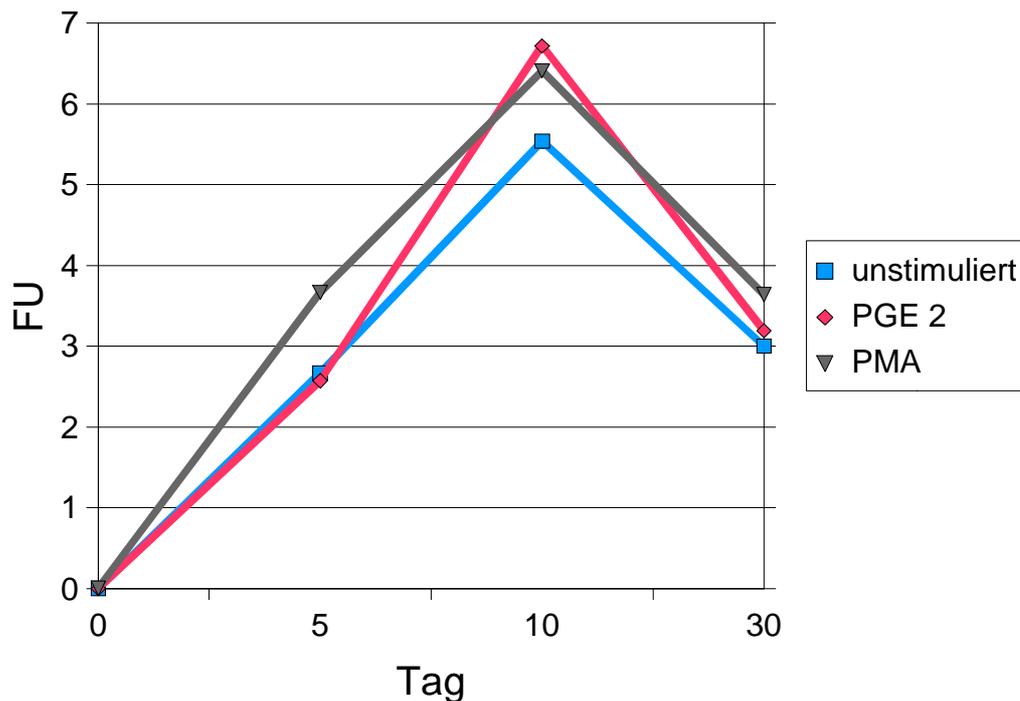


Abbildung 87 Vergleich stimulierten gegen unstimuliertes Integrin  $\alpha 3$ . Mittlere SD=33%

## Stimuliertes vs. unstimuliertes MHC I

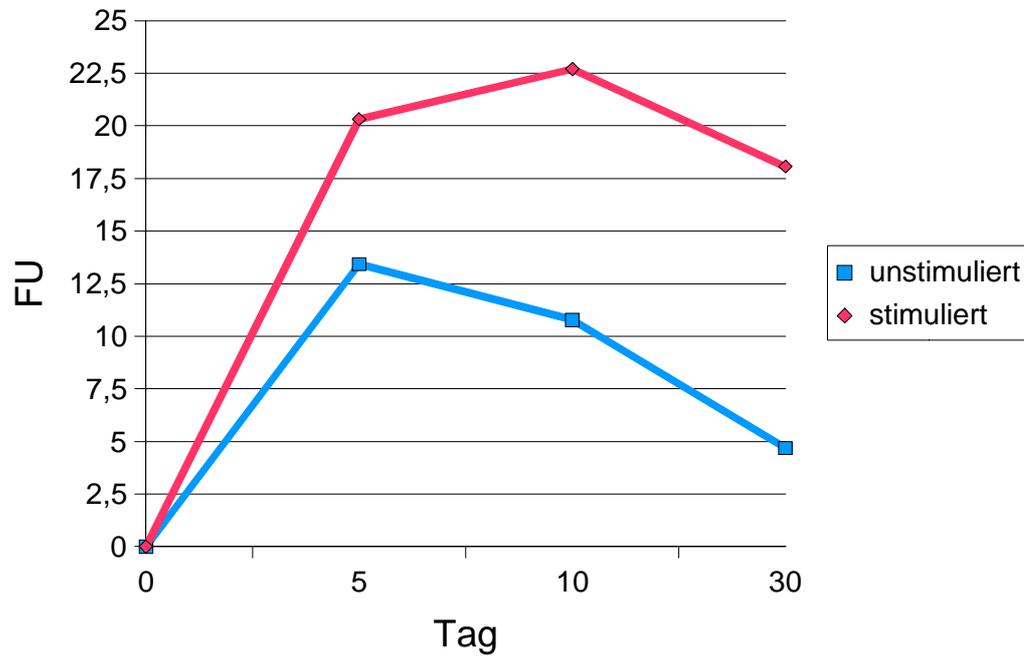


Abbildung 88: Vergleich stimulierten gegen unstimuliertes MHC-I auf einer dreidimensionalen Kollagenmatrix mit flüssigem Matrigel im Überstand. Mittlere SD=35%

## Vergleich MHC II 2D vs. 3D

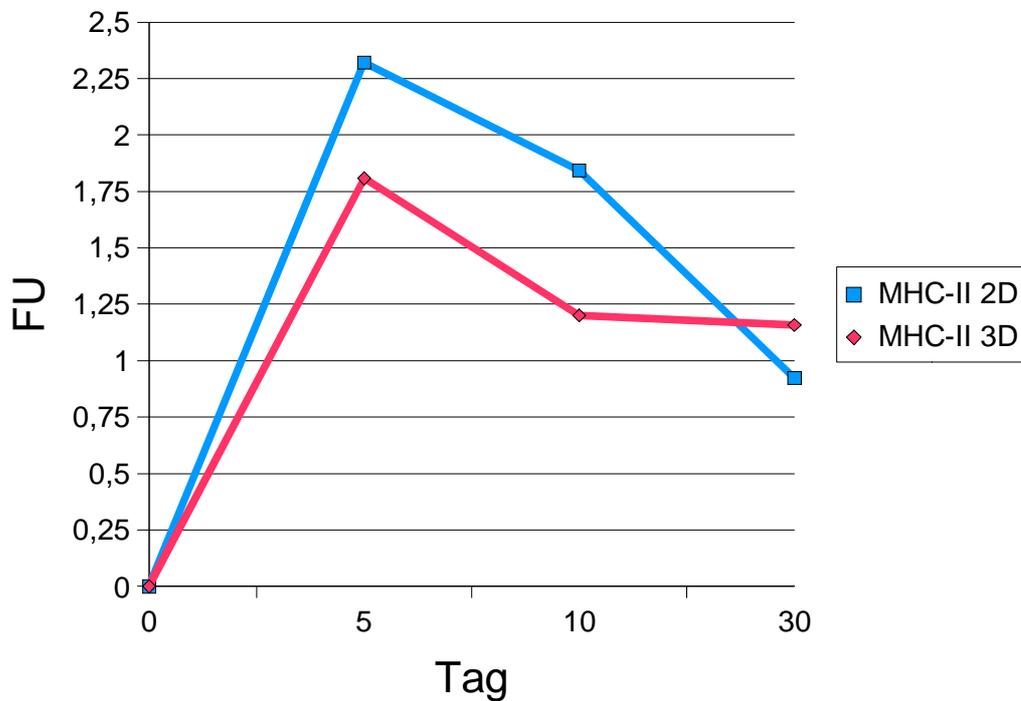


Abbildung 89: Vergleich des stimulierten MHC-II zwischen einer zweidimensionalen Matrigelmatrix und einer dreidimensionalen Collagenmatrix mit flüssigem Matrigel im Überstand. Mittlere SD=29%

## Vergleich MHC II Stimuliert vs unstimuliert

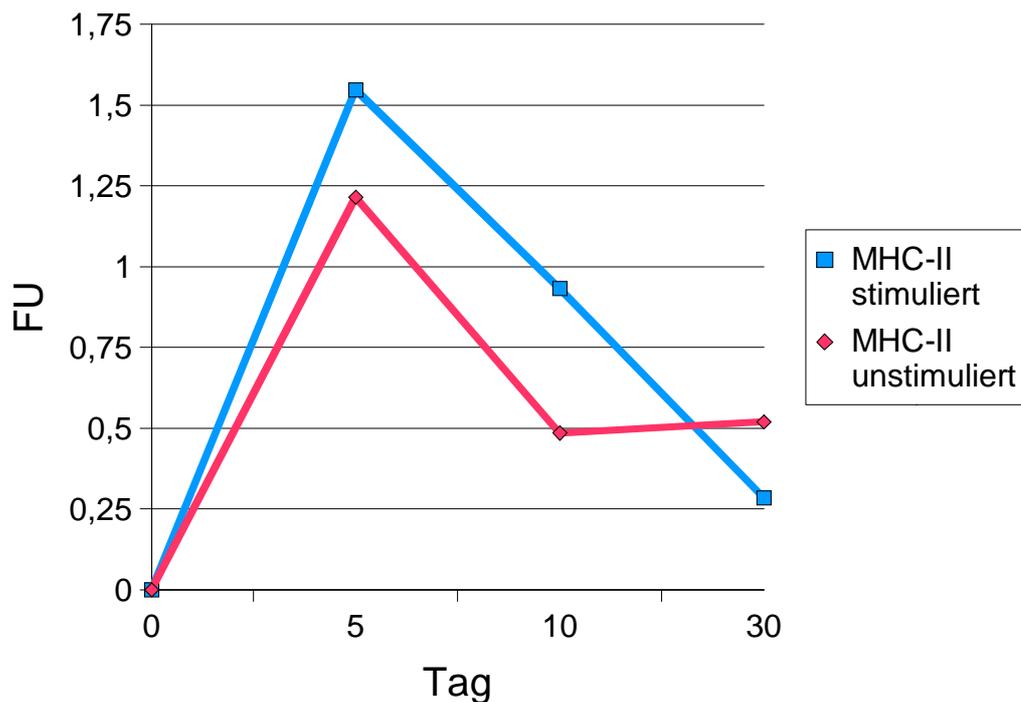


Abbildung 90: Vergleich stimulierten gegen unstimuliertes MHC-II auf einer dreidimensionalen Kollagenmatrix mit flüssigem Matrigel im Überstand. Mittlere SD=27%

## Integrin $\alpha 2$ vs. MHC-II

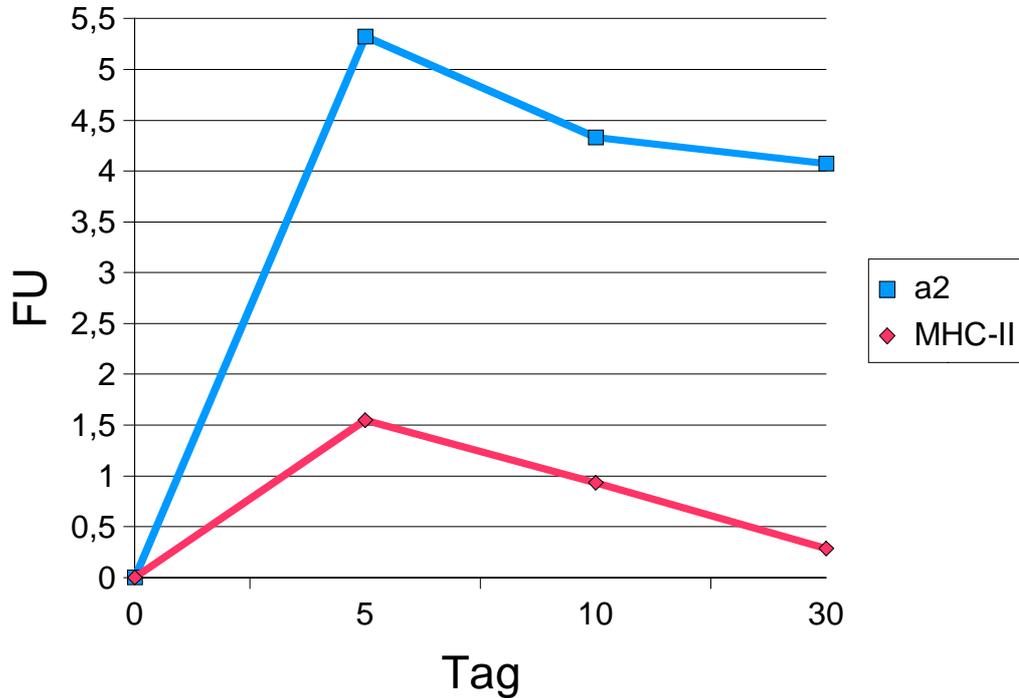


Abbildung 91 Vergleich des nicht-physiologisch exprimierten Integrins  $\alpha 2$  gegen MHC-II auf einer zweidimensionalen Matrigel-Matrix. Mittlere SD=31%

## Integrin $\alpha 2$ vs. MHC-II

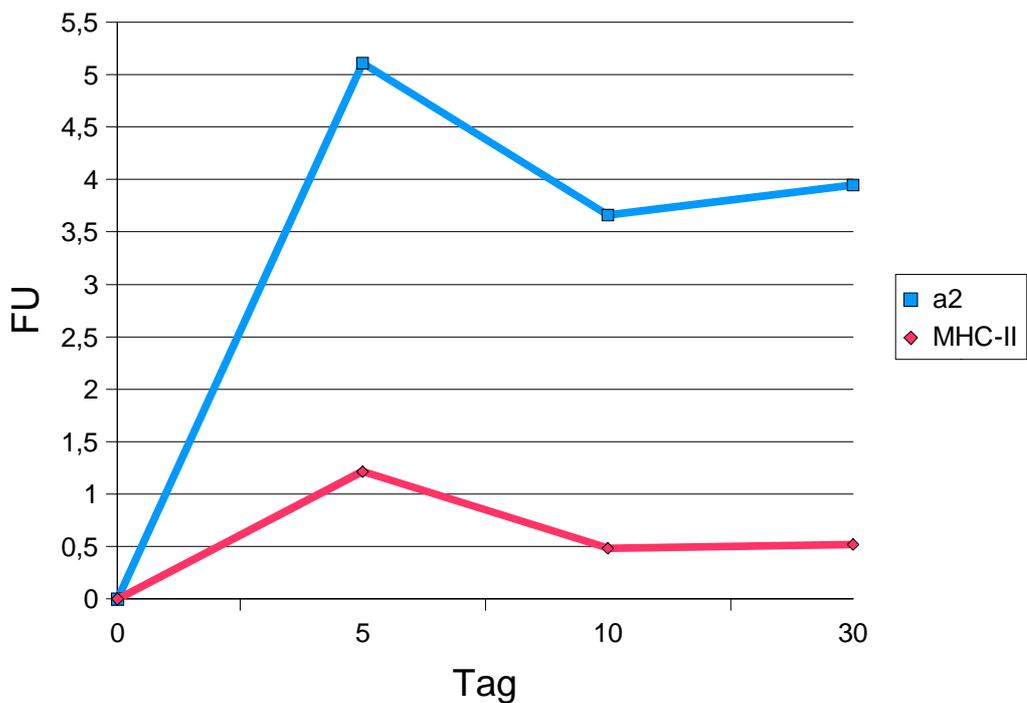


Abbildung 92 Vergleich des nicht-physiologisch exprimierten Integrins  $\alpha 2$  gegen MHC-II auf einer dreidimensionalen Collagen-I-Matrix mit darüber befindlichem flüssigem Matrigel. Mittlere SD=33%

## **4. Diskussion**

### **4.1 Einleitung**

Die vielfältigen kongenitalen oder inflammatorischen Pathologien der Leber sowie deren zentrale Rolle in vielen Stoffwechselwegen kann im Falle eines Leberausfalles meist rasch zu einem fatalen Ende führen. Obwohl ihre Funktion durch ein Transplantat übernommen werden kann, führt doch die bestehende und sich in absehbarer Zeit nicht ändernde Organknappheit in vielen Fällen häufig zu einem „Tod auf der Warteliste“, wie in der UNOS-Liste beschrieben (Harper *et al.*, 1999).

Verschiedene Wege sind beschritten worden, um das Problem der Organknappheit zu lösen. So wurde mittels der „split liver transplantation“ der Versuch unternommen, ein Transplantat auf mehrere Empfänger zu verteilen. Jedoch sind auch in diesem Falle der Transplantierbarkeit Grenzen gesetzt, da das Transplantat für eine erfolgreiche Transplantation über eine entsprechende Größe verfügen muß. Weiterhin sind die für eine Perfusion mit Blut nötigen Gefäße sowie die für hepatische Eliminationen nötigen Gallenwege bei kleinen Transplantaten nicht gegeben. Einen Ausweg kann die Transplantation von Hepatozyten oder die Verwendung eines Hepatozyten-Bioreaktors darstellen, wobei letzterer zur temporären Überbrückung der Leberfunktion bis zu einer erfolgreichen Lebertransplantation verwandt werden kann. Für den Einsatz von Zellkulturen müssen jedoch verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein, um zu einem zufriedenstellenden Ergebnis im Hinblick auf die erforderliche Synthese- wie Exkretionsleistung zu kommen. Hierbei wichtig sind eine ausreichende Versorgung mit Hepatozyten, möglichst eine selbständige Proliferation von Hepatozyten, um eine ausreichend lange Therapiedauer zu erreichen, sowie die Aufrechterhaltung eines differenzierten Zustandes, um der physiologischen Funktion der Leber gerecht zu werden.

### **4.2 Hepatozytenisolation**

Die Gewinnung von Hepatozyten wurde bereits in den sechziger Jahren beschrieben (Zucker-

man *et al.*, 1967), jedoch waren die Zellausbeuten zu der damaligen Zeit sehr gering. Eine deutliche Verbesserung der Methode gelang mit der 1969 von Berry und Friend (Berry and Friend, 1969) beschriebenen 2-Schritt-Perfusionsmethode, die 1981 von Reese und Byard (Reese and Byard, 1981) auf humane Hepatozyten adaptiert worden und in den folgenden Jahren in vielfachen Abwandlungen zur Gewinnung von humanen Hepatozyten eingesetzt worden ist (Schroder *et al.*, 1994). Jedoch muß eine Heterogenität der gewonnenen Zellen, die je nach Ursprungsort innerhalb des Leberazinus eine unterschiedliche Enzymausstattung besitzen können, in Kauf genommen werden (Gumucio, 1989). Eine weitere Verbesserung der Ausbeute konnte durch die Verwendung druckkontrollierter Perfusionstechniken erreicht werden (Ryan *et al.*, 1993). Weitere Problematiken wie die Aufbewahrung und Kryopreservation von Hepatozyten vor dem klinischen Einsatz (Traiser *et al.*, 1994) und die erwähnte Heterogenität der isolierten Zellen sind jedoch noch nicht zufriedenstellend gelöst worden.

### 4.3 Proliferation

Die Proliferationsfähigkeit der Leber war schon in der Antike bekannt und findet Ausdruck in der Sage des Prometheus, dem ein von Zeus geschickter Adler täglich ein Stück der Leber entreißt. Die Regenerationsfähigkeit der Leber bewirkte jedoch ein Nachwachsen, so daß Prometheus nicht durch den fortwährenden Verlust seiner Lebermasse starb.

Die *in vivo*-Proliferationsfähigkeit der Leber stellt sich am besten an Hand der 1895 von Eck entwickelten und nach ihm benannten Fistel dar. Bei dieser an Hunden durchgeführten Operation wurde eine portocavale Anstomose durchgeführt, die in der Folge zu einer Leberatrophie führte. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ob diesem eine Verminderung des der Leber zugeführten Blutvolumens oder ein Mangel an Wachstumsfaktoren zugrunde liegt. In Transplantationsversuchen an Hunden, die eine zweite Leber implantiert bekamen, konnte Starzl jedoch in den 60er Jahren zeigen, daß ein fehlender Blutzufuß aus dem Portalgebiet eine Atrophie der entsprechenden Leber bewirkte, während die andere, an das Portalsystem angeschlossene Leber ihre volle Funktionsfähigkeit behielt (Francavilla *et al.*, 1994). In der Folge wurde die Existenz verschiedener Leber-Wachstumsfaktoren postuliert (Francavilla *et al.*, 1994) und verschiedene Experimente zur Proliferation von Hepatozyten unternommen. Dabei wurden unterschiedliche Beobachtungen hinsichtlich der Proliferationsfähigkeit von Hepatozyten gemacht. Einige Wissenschaftler postulierten die Existenz eines Stammzellkompartimentes,

das untergegangene Hepatozyten durch Teilung und Differenzierung ersetzen sollte. So konnten Lenzi *et al.* (Lenzi *et al.*, 1992) demonstrieren, daß periportal gelegene, als „oval cells“ bezeichnete kleine epitheloide Zellen mit ovalären Zellkernen die Zytokeratine 7,8,18 und 19 aufweisen und somit biliären Zellen ähneln. Einige wenige Zellen stellen sich auch immunhistochemisch albuminenthaltend dar. Nach Gabe von Ethionin, einem zytotoxischen, zur Entartung führenden Analogon des Methionins, kommt es zu einer Proliferation der „oval cells“. Tee *et al.* konnten (Tee *et al.*, 1996) ebenfalls darlegen, daß „oval cells“ unter Gabe von Ethionin proliferieren, weiterhin differenzierten sie nach 4-5 Wochen aus und exprimierten Marker, die bei einigen Zellen auf ein mehr biliäres Erscheinungsbild, bei anderen auf ein mehr hepatozytäres Muster schließen lassen. Lazaro *et al.* (Lazaro *et al.*, 1998) konnten nachweisen, daß „oval cells“ nach 4 Wochen ebenfalls einen hepatozytenähnlichen Phänotyp annehmen und die Zytokeratine 8 und 18, nicht aber 19 exprimieren.

Alison *et al.* (Alison, 1998; Alison *et al.*, 1997a; Alison *et al.*, 1997b; Alison *et al.*, 1996) konnten darlegen, daß die Gabe von 2-Azetylaminofluoren ebenfalls Hepatozyten schädigt und „oval cells“ in der Folge proliferieren können. Diese wiesen wie nach Gabe von Ethionin ein biliäres Erscheinungsbild auf und exprimierten die Zytokeratine 7, 8, 18 und 19, zusätzlich auch Vimentin, das einen Marker für mesenchymale Zellen darstellt. Nach einer Woche zeigte sich eine beginnende Differenzierung zu Hepatozyten, die Expression von Zytokeratin 19 ließ sich nicht mehr detektieren. Anilkumar (Anilkumar *et al.*, 1995) konnte dies bestätigen und nachweisen, daß bei hohen Dosen an 2-Azetylaminofluoren einige „oval cells“ auch eine intestinale Differenzierung aufweisen können. Sarraf *et al.* (Sarraf *et al.*, 1994) schließlich konnte über Farbinjektionen in das intrahepatische Gallengangssystem demonstrieren, daß vermutlich biliäre Zellen Vorgänger der „oval cells“ sind.

Sell *et al.* (Sell, 1997; Sell and Pierce, 1994) sowie Yin *et al.* (Yin *et al.*, 1999) untersuchten die Proliferationsfähigkeit von hepatischen Stammzellen nach intraperitonealer Applikation von Allyl-Alkohol, einem bekannten Induktor periportal Hepatozytennekrosen. Sie fanden, daß ähnlich wie nach der Applikation von 2-Azetylaminofluoren im periportal Raum undifferenzierte Zellen proliferieren, die Charakteristika von „oval cells“ aufweisen und sich im weiteren Verlauf zu duktilären Zellen oder Hepatozyten differenzieren können. Weiterhin konnten sie eine begleitende Reaktion von Ito-Zellen und Kupffer-Zellen zeigen, wobei erstere kleine Gruppen von „oval cells“, die bälkchenartige Strukturen bildeten, umgaben, während in letzteren und um proliferierende „oval cells“ Fibronectin nachweisbar war.

Gordon *et al.* (Gordon *et al.*, 2000) untersuchten die Regenerationsfähigkeit von Hepatozyten

nach Retrorsin-Gabe, einem Senecionin-ähnlichen Pyrrolizidin-Alkaloid, und fanden eine nur geringe Proliferation von „oval cells“ bei nicht vorhandener Proliferation von Hepatozyten. Die Leber teilhepatektomierter Ratten konnte dennoch vollständig ersetzt werden, nach Retrorsin-Gabe kam es zur Ausbildung kleiner hepatozytenähnlicher Zellen, die jedoch auch funktionelle Marker von fetalen Hepatoblasten wie die Ausbildung von Gallenkanälchen und von „oval cells“ wie die Expression des Markers OC.2 aufwiesen. Die Autoren schlossen auf eine weitere mögliche Stammzellpopulation, die nach einer Schädigung Lebergewebe zu ersetzen vermag.

Petersen et al. (Petersen *et al.*, 1999) konnten darlegen, daß nicht nur hepatische Zellen mögliche Stammzeleigenschaften in Bezug auf die Leberregeneration haben, sondern das auch Knochenmarkszellen unter bestimmten Umständen zu Hepatozyten differenzieren können. Sie untersuchten Ratten, die teilhepatektomiert und mit 2-Azetylamino fluoreszenz markiert worden waren und in der Folge knochenmarkstransplantiert wurden, auf das Vorhandensein von Y-Chromosomen sowie der Dipeptidyltransferase IV in der Leber. Bei kreuztransplantierten Tieren konnte das Vorhandensein von Y-Chromosomen in Hepatozyten nachgewiesen werden, was die Autoren als Beweis für eine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Hepatozyten werteten.

Andere Autoren wiederum sprachen die Hauptfähigkeit der Regeneration den Hepatozyten selbst zu, die sich in der Folge eines Zellunterganges unter bestimmten Umständen teilen können. So konnten Kitten et al. (Kitten and Ferry, 1998) nach genetischer Markierung von Hepatozyten und der darauffolgenden Gabe von D-Galactosamin eine Proliferation von Hepatozyten nachweisen, „oval cells“ zeigten keine vermehrte Proliferation. Ponder (Ponder, 1996) beschrieb ebenfalls ein Modell, demzufolge sich Hepatozyten unter physiologischen Umständen und geringen Schädigungen teilen können. Michalopoulos (Michalopoulos and Zarnegar, 1992) und Block (Block *et al.*, 1996) beschrieben die Proliferation von Hepatozyten während der Kultivierung mit einem chemisch definierten Wachstumsmedium und sprachen den verwendeten Wachstumsfaktoren, insbesondere HGF, eine herausragende Rolle zu.

Am wahrscheinlichsten scheint jedoch eine Synthese der Hypothese, daß Hepatozyten aus einem eigenen hepatischen Stammzellreservoir hervorgehen, mit der Hypothese, daß Hepatozyten selbst die Stammzellen in der Leber darstellen. Diese Theorie wird unter anderem von Ponder (Ponder, 1996) beschrieben. Sie nahm eine Replikationsfähigkeit der Hepatozyten unter normalen Umständen und einem nicht allzu großen Schädigungsreiz an. Hingegen käme es nach großen Schädigungsereignissen und dem Verlust eines großen Teiles der Lebermasse zu einer Reaktion im Stammzellkompartiment, von dem aus eine Regeneration erfolgen könne.

Möglicherweise spielt eine Vielzahl von mittlerweile bekannten Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Proliferation von Hepatozyten, so beschrieben Francavilla et al. (Francavilla *et al.*, 1994) 8 hepatotrophe Substanzen, darunter EGF (epithelial growth factor), HGF (hepatocyte growth factor), TGF- $\alpha$  (transforming growth factor  $\alpha$ ), ALR (augmenter of liver regeneration), Insulin oder IGF-II (insulin-like growth factor II). Auch Immunsuppressiva wie Cyclosporin oder FK 506 scheinen eine bestimmte Mitogenität aufzuweisen. Jedoch können Zytokine wie TGF- $\beta$  oder das Immunsuppressivum Rapamycin auch mitoseinhibierend wirken. Michalopoulos beschrieb HGF eingehend und weist darauf hin, daß es auf molarer Basis das stärkste Hepatozyten-Mitogen sei. Fausto et al. (Fausto *et al.*, 1995) beschrieben ebenfalls die Mitogenität von EGF, HGF und TGF- $\alpha$ , wiesen jedoch darauf hin, daß Hepatozyten erst zur Zellteilung angeregt werden und dabei aus der G0-Phase in eine G1-Phase zurückkehren müssen. Diese Anregung zur Zellteilung sprachen sie Substanzen wie TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrosefaktor  $\alpha$ ) oder IL-6 (Interleukin 6) zu. Diehl et al. (Diehl and Rai, 1996) beschrieben zusätzlich noch den mitogenen Einfluß von Glucagon, Thyroxin oder Trijod-Thyronin, Parathormon, Prolactin oder Östrogenen, sie forderten ebenfalls eine Überführung der Hepatozyten aus der G0 in die G1-Phase und wiesen dabei zusätzlich auf die Eigenschaften von IL-1 hin.

Insgesamt können Hepatozyten unter geeigneten Bedingungen zur Proliferation angeregt werden, jedoch wiesen alle Autoren darauf hin, daß proliferierende Hepatozyten degenerieren und hepatozytenspezifische Funktionen verlieren können.

## 4.4 Differenzierung

Haralson (Haralson, 1993) wies darauf hin, daß Differenzierung ein komplexes Problem sei, das von verschiedenen Faktoren reguliert wird. Er beschrieb eine Regulation durch extrazelluläre Matrix, Hormone oder hormonähnlich wirkende Vitamine, Zytokine und interzelluläre Kontakte, die Einfluß auf Wachstum, Form, Differenzierung und zelluläre Biochemie nehmen könnten. LaBrecque (LaBrecque, 1994) deutete dabei die Vielzahl an Einflußmöglichkeiten als ein Puzzle, in dem sich verschiedene Faktoren gegenseitig synergistisch oder antagonistisch beeinflussen können, jedoch sei das Zusammenspiel dieser Faktoren derzeit noch kaum bekannt.

James et al. (James *et al.*, 1992) beschrieben ein Modell, bei dem isolierte nichtparenchymale

Zellen der Lebern (epitheliale Zellen wie Hepatozyten oder Cholangiozyten zusammen mit Endothelien oder Fibrozyten) in Kultur gehalten wurden. Auch nach mehr als einem Monat konnten das Zytochrom P450 IVA1 sowie peroxisomale Marker in mit frisch isolierten Hepatozyten vergleichbaren Mengen isoliert werden. Sie beschrieben ebenfalls Versuche mit verschiedenen bestrahlten und dadurch abgetöten Zelllinien wie 3T3 Fibroblasten oder einer Zelllinie aus humanen cornealen Endothelzellen, konnten jedoch keine vergleichbaren Ergebnisse hinsichtlich der Beibehaltung der Differenzierung erzielen. Lazaro et al. (Lazaro *et al.*, 1998) unternahmten ähnliche Versuche, konnten jedoch mit Fibroblasten als basaler Zelllage nicht-tumorös veränderte Zelllinien, die von „oval cells“ abstammten, zur Differenzierung bringen und große Mengen an rauhem endoplasmatischem Retikulum, Peroxisomen, Mitochondrien und die Zytokeratine 8 und 18, nicht jedoch 19 nachweisen. Ohne Fibroblasten, jedoch in der Gegenwart von HGF differenzierte die Zelllinie zu duktalem Elementen, die eher gallengangsähnlichen Strukturen glichen. Roberts et al. (Roberts *et al.*, 1994) konnten nachweisen, daß Hepatozyten, die aus normalem Lebergewebe gewonnen worden waren, in Kokultur mit Ratten-Leberepithelien sowie in durch HepG2-Zellen konditioniertem Medium über Jahre in Kultur gehalten werden konnten und hepatozytenspezifische Funktionen wie Albumin-Produktion, Transferrin-Produktion und Glucose-6-Phosphatase-Expression sowie eine Induzierbarkeit der Arylhydrocarbon-Hydroxylase zeigten. Eine Versuchsansatz, der eine volle Differenzierung ermöglicht, konnte bis jetzt jedoch noch nicht beschrieben werden.

Die Verwendung von Hormonen zur Differenzierung von Hepatozyten wurde ebenfalls von mehreren Autoren beschrieben. So zeigten Terry et al. (Terry and Gallin, 1994) die differenzierende Wirkung von Ornithin, Dexamethason und Insulin auf die Entwicklung intrahepatischer Hering'scher Kanälchen. Zugabe von fötalem Kälberserum konnte diesen Effekt jedoch wieder zunichte machen und legt nahe, daß in fötalem Kälberserum Faktoren enthalten sind, die eine Dedifferenzierung von Hepatozyten bewirken können. Tateno et al. (Tateno and Yoshizato, 1999) berichteten über ein Medium, daß sowohl Proliferation wie auch Differenzierung von Hepatozyten ermöglicht und neben fötalem Kälberserum EGF, Nicotinamid, Ascorbinsäure-2-Phosphat sowie Dimethylsulfoxid enthält. Die Autoren beschrieben dabei eine klonale Expansion von Hepatozyten, die sich hierbei mehr als 10 mal geteilt haben müssen. Falasca et al. (Falasca *et al.*, 1998a; Falasca *et al.*, 1998b) demonstrierten die differenzierungsfördernden Eigenschaften von Retinsäure, die sich ihrer Meinung nach auf das Zytoskelett auswirkt und weniger die Menge an zytoskelettalen Proteinen beeinflusst als vielmehr eine posttranslationale Modifikation derselben bewirkt. Sie konnten zeigen, daß unter dem Einfluß von Retinsäure Hepatozyten ihre polygonale Form wieder annehmen und das Zytoskelett sich wie in intakten

Hepatozyten verhält.

Pagan et al. (Pagan et al., 1995; Pagan et al., 1999) stellten den Einfluß verschiedener Zytokine auf das Differenzierungsverhalten von Hepatozyten dar. So konnten sie unter Gabe von EGF und HGF eine Vermehrung der zytoskelettalen Zytokeratine, unter TGF- $\beta$ 1 jedoch eine Verminderung der Zytokeratine nachweisen. TGF- $\beta$ 1 konnte gleichzeitig eine vermehrte Expression von Vimentin bewirken, welche durch die Zugabe von Dimethylsulfoxid verhindert werden konnte. Dimethylsulfoxid und TGF- $\beta$ 1 konnten beide die mitogenen Eigenschaften von EGF und HGF antagonisieren, zusätzlich konnte DMSO eine Vermehrung der Expression zytoskelettaler Zytokeratine bewirken. Die Expression von Albumin war in allen Fällen vermindert.

Block et al. (Block *et al.*, 1996) beschrieben ebenso wie Runge et al. (Runge *et al.*, 1999; Runge *et al.*, 2000) ein chemisch definiertes Medium, welches Hepatozyten proliferieren, aber auch differenzieren lassen konnte. Unter dem Einfluß von TGF- $\alpha$  sowie von aFGF kam es zu einer abgeflachten Zellmorphologie, Zellorganellen ließen sich vermindert abgrenzen. Weiterhin konnte die zusätzliche Gabe von HGF duktiläre Strukturen induzieren, die intrahepatischen Gallengängen glichen.

Stolz et al. (Stolz and Michalopoulos, 1994) konnten bei Hepatozyten in Zellkulturen ebenfalls eine abgeflachte Morphologie nach Gabe von HGF aufzeigen, sie fanden überdies 4 Isoformen der MAP-Kinase, die sich durch EGF wie HGF induzieren ließen und einer intrazellulären Signaltransduktion entsprechen.

Der Einfluß extrazellulärer Matrixkomponenten ist ebenfalls mehrfach untersucht worden. De-preter et al. (De-preter *et al.*, 2000) konnten eine Reduktion der Anzahl an hepatozytischen Peroxisomen sowie eine Reduktion der peroxisomalen Enzyme Katalase und Glutathion-S-Transferase in Hepatozyten, die als Rasen auf einem basalen Kollagen-Gel (sog. „single gel technique“) ausgesät worden waren, nachweisen. Hingegen konnten an das Normale grenzende Werte an Peroxisomen sowie peroxisomalen Enzymen in Hepatozyten gemessen werden, die sich zwischen 2 Kollagen-Gelen und somit in einer dreidimensionalen Matrix befanden (sog. „Sandwichansatz“).

Ähnlich konnten Bader et al. (Bader *et al.*, 1996) eine vermehrte Expression von Cytochrom P 450 3A in Hepatozyten-Sandwich-Kulturen gegenüber Hepatozyten, die in single-gel-Technik ausplattiert worden waren, darstellen, Knop et al. (Knop *et al.*, 1995) zeigten in einem ähnlichen Versuchsansatz eine vermehrte Expression von Albumin in Sandwich- gegenüber der

single-gel-Technik. Weiterhin konnten sie eine erhaltene Struktur der interzellulären Gallengänge, des endoplasmatischen Retikulums sowie der intrazellulären Intermediärfilamente im Sandwich-Ansatz belegen, während erstere in single-gel-Technik deutlich abnahmen und die Intermediärfilamente unterhalb der Zellmembran ausgeprägte Aggregate formten. Ryan et al. (Ryan *et al.*, 1993) konnten in Collagen-Sandwich-Ansätzen eine typische polygonale Morphologie und vermehrte Albumin-Produktion nachweisen, auf basalen Collagen-Gelen hingegen nahmen die Zellen eine flache Morphologie an und synthetisierten deutlich weniger Albumin. Ähnlich beschreibt auch Jones eine vermehrte Expression von Albumin im Sandwichansatz, während Hepatozyten auf einzelnen Collagen-Gelen geringere Mengen an Albumin synthetisieren.

Auch einzelne Matrixkomponenten wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Differenzierung von Hepatozyten untersucht. So beschrieb Burt (Burt, 1993) eine Dedifferenzierung von Hepatozyten auf Collagen-Gelen, hingegen blieb die Synthese von Albumin oder die Expression von Zytochrom P450-Enzymen auf Matrigel erhalten. Auch Strain (Strain, 1994; Strain *et al.*, 1995) beschrieb die differenzierende Wirkung von Matrigel, wies jedoch darauf hin, daß ein Collagen-Sandwich-Ansatz eine noch bessere Differenzierung bewirke.

Rana et al. (Rana *et al.*, 1994) konnten unterschiedliche Differenzierungszustände kultivierter Hepatozyten abhängig von verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix nachweisen. So konnten sie auf Kollagengelen eine vermehrte Synthese der Transkriptionsfaktoren c-jun und AP-1 belegen, die gewöhnlich auf eine verminderte Differenzierung hinweisen, auf der basalmembranähnlichen Matrix „Matrigel“, gewonnen aus dem Englebreth-Holm-Swarm-Tumor hingegen ein nahezu normales Transkriptionsverhalten. Außerdem sinke das Verhältnis der Transkriptionsfaktoren C/EBP  $\alpha$  zu C/EBP  $\beta$  auf Collagen-Gelen ab, was auf eine verminderte Differenzierung hinweise, jedoch entspreche die Expression von C/EBP  $\alpha$  auf Matrigel nahezu den Werten in intaktem Lebergewebe.

Bhadriraju et al. (Bhadriraju and Hansen, 2000) konnten schließlich zeigen, daß die Zellmorphologie sich mittels synthetischer Proteine für bestimmte Zelloberflächenrezeptoren selektiv beeinflussen läßt. Hierbei wiesen diese Integrine genannten Zelloberflächenproteine eine Bindungsspezifität für Proteine auf, die das sogenannte RGD-Motiv, bestehend aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Aspartat, aufweisen. Block et al. (Block *et al.*, 1996) konnten zeigen, daß Hepatozyten auf Collagen eher duktiläre Strukturen exprimieren, während eine Kultivierung auf Matrigel einen nahezu normalen Phänotyp bewirkt.

Sudhakaran et al. (Sudhakaran *et al.*, 1986) konnten zeigen, daß Hepatozyten, die auf unterschiedlichen extrazellulären Matrices ausplattiert wurden, eine unterschiedliche Differenzierung erreichen. So konnte generell eine Verminderung der Albumin-Synthese nachgewiesen werden, jedoch kam es zu unterschiedlichen Syntheseraten an  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP), das in der Regel von undifferenzierten Hepatoblasten exprimiert wird. Die AFP-Expression war dabei am höchsten auf Laminin, während sie auf Collagen IV am geringsten war. Die Expression der Tyrosin-Aminotransferase konnte jedoch unter Stimulation mit Dexamethason immer nachgewiesen werden, in dieser Hinsicht verhielten sich die Zellen in Zellkultur differenziert. Sanchez (Sanchez *et al.*, 2000) hingegen beschrieb die differenzierungsfördernde Wirkung von Fibronectin, das bei Hepatozyten in Zellkultur eine Entwicklung von Zellsträngen, die an die radiäre Anordnung der Zellstränge im Leberazinus erinnern, bewirke. Außerdem konnte sie hohe Syntheseraten an Albumin nachweisen. Kontrollversuche auf Collagen ergab eine verminderte Albumin-Synthese und eine verschlechterte Hepatozyten-Morphologie.

Ben-Ze'ev (Ben-Ze'ev, 1984a; Ben-Ze'ev, 1984b; Ben-Ze'ev, 1986) schließlich führte aus, daß Zellform und Differenzierung einander durch die Kontrolle der Protein-Expression und der DNA-Synthese beeinflussen.

## 4.5 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix umfaßt einen bedeutenden Teil des menschlichen Körpers. So wird allein ein Drittel des gesamten Körperproteins durch Kollagene gebildet. Lange Zeit wurde sie als Stroma, als Stützmaterial des Körpers angesehen. Jedoch hat sich die Ansicht durchgesetzt, daß die extrazelluläre Matrix auch wichtige Aufgaben wie die Zell-Zell-Kommunikation unterstützt, so daß ihr eine erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet werden muß (Schuppan, 1990; Schuppan and Riecken, 1990). Die extrazelluläre Matrix läßt sich einteilen in Kollagene, Glykoproteine und Proteoglykane.

Zu den Kollagenen gehören mindestens 13 Typen, in der Leber sind jedoch nicht alle Typen vertreten. Collagen I, II und V bilden lange Fibrillen und sind für die Struktur und Festigkeit der extrazellulären Matrix von Bedeutung. Elektronenmikroskopisch kommt eine 67 nm-Periodizität zum Ausdruck, die für die bekannte Tripel-Helix dieser Kollagene spricht. Collagen IV kommt als netzartiges strukturelles Rückgrad der Basalmembranen auch in der Leber vor, dort

hauptsächlich im Bereich der Glisson'schen Trias um Gefäße und Gallengänge. Collagen VI bildet ebenfalls Fibrillen, die sich hauptsächlich in Nachbarschaft mit Blutgefäßen, Nerven und andere Collagen-Fasern befinden.

Zu den Glykoproteinen der Leber gehören Laminin, Fibronectin, Tenascin, Undulin, Thrombospondin und Entactin.

Laminin ist ein heterotrimeres 900 kDa Glykoprotein, das in mehreren Unterformen auftritt (Martinez-Hernandez and Amenta, 1995; Schuppan, 1990; Schuppan and Riecken, 1990). Normalerweise ist es nicht im Dissé'schen Raum vorhanden (Martinez-Hernandez and Amenta, 1995; Schuppan, 1990), es tritt jedoch während einer entstehenden Leberzirrhose vermehrt auf und kann sowohl von Ito-Zellen wie auch von Endothelzellen produziert werden. In adulter, ungeschädigter Leber treten nur die Laminin-Ketten  $\beta 1$  und  $\gamma 1$  auf, eine  $\alpha 1$ -Kette tritt nur während der Entwicklung einer Fibrose auf. M-Laminin enthält statt der  $\alpha 1$  eine  $\alpha 2$ -Kette, es tritt nur im sich entwickelnden und regenerierenden Organ auf. S-Laminin enthält statt der  $\beta 1$  eine  $\beta 2$ -Kette und tritt ebenfalls nur bei sich entwickelnder oder regenerierender Leber auf, zusätzlich läßt es sich konstitutiv im Portalfeld nachweisen. (Maher and Bissell, 1993). Von Bedeutung ist, daß eine  $\alpha 1$ -Kette auch in Nieren nur zum Zeitpunkt der Differenzierung der primitiven Tubuli auftritt. (Simon-Assmann *et al.*, 1995)

Fibronectin ist ein 540 kDa Dimer, das in den meisten Interstitien nachweisbar ist und die Bindung von Zellen an Collagen, Fibrin und Heparin vermittelt. Mindestens 10, durch alternatives Splicing hervorgerufene Isoformen existieren, deren eine den Großteil des im Plasma nachweisbaren Fibronectins darstellt, dessen Hauptsyntheseort die Hepatozyten selbst sind (Schuppan, 1990; Schuppan and Riecken, 1990; Simon-Assmann *et al.*, 1995). In der Leber kommt hauptsächlich passiv an die Basalmembran absorbiertes Plasmafibronectin zur Darstellung, jedoch konnten geringe Mengen anderer Fibronectin-Varianten nachgewiesen werden, die in der Leber selbst gebildet worden sind.

Tenascin kommt im Mesenchym sich differenzierender Zellen zur Darstellung. Es scheint die starke Verbindung von Zellen mit Fibronectin zu vermindern und Prozesse wie Zellteilung oder Dedifferenzierung erst zu ermöglichen (Schuppan, 1990).

Undulin kommt komplementär zu Tenascin nur im differenzierten Mesenchym vor. Interessant ist seine Sequenzhomologie sowohl zu Fibronectin wie auch zu Tenascin, so daß sie möglicherweise die Mitglieder einer Superfamilie bilden könnten. (Schuppan, 1990)

Die Rolle von Thrombospondin als Teil der extrazellulären Matrix ist eher unklar. Es wurde erstmals als ein von stimulierten Thrombozyten freigesetztes Protein beschrieben, später wurde erkannt, daß es sich in Nachbarschaft mit Collagen V in der Intima von Blutgefäßen und in Basalmembranen befindet. (Schuppan, 1990)

Entactin ist ebenfalls ein konstitutives Element der Basalmembran und interagiert mit dem zentralen Bereich des kreuzförmigen Laminins, möglicherweise die Interaktion von Laminin mit bindenden Zellen modulierend. (Schuppan, 1990)

Die Proteoglycane der Leber sind nicht genau bekannt, da sie während der Verarbeitungsschritte zur immunhistochemischen Untersuchung meistens dehydrieren und sich in der Folge nur schwer nachweisen lassen. (Martinez-Hernandez and Amenta, 1993a; Martinez-Hernandez and Amenta, 1993b)

Eine Besonderheit der Leber ist das fast völlige Fehlen einer Basalmembran um die azinären Hepatozyten (Martinez-Hernandez and Amenta, 1993a; Martinez-Hernandez and Amenta, 1993b). Lediglich Fibronectin ist in größeren Mengen vorhanden, während Collagen IV und Collagen I mengenmäßig eine untergeordnete Rolle spielen. Laminin kommt in normalem Lebergewebe nur in der Nachbarschaft der Basalmembranen von Gallengängen und größeren Gefäßen vor (Burt *et al.*, 1990; Martinez-Hernandez and Amenta, 1993a; Martinez-Hernandez and Amenta, 1993b).

Während der Regeneration der Leber nach Hepatektomie kommt es zu einer Ausbildung von Hepatozytenaggregaten, die nur von einer dünnen, hauptsächlich aus Fibronectin bestehenden Matrix umgeben sind. Collagen I und Laminin treten erst bei Zuständen stark gestörter Leberfunktion wie der Zirrhoseentstehung auf, hierbei ist insbesondere die Transformation der Sinusoide zu Kapillaren in der zirrhotisch veränderten Leber zu erwähnen. (Bissell, 1998; Martinez-Hernandez and Amenta, 1993a; Martinez-Hernandez and Amenta, 1993b; Martinez-Hernandez *et al.*, 1991)

Der Einfluß verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix ist schon vielfach untersucht worden. So berichteten Maher *et al.* über den Effekt einer dreidimensionalen Extrazellulärmatrix und den Vorteilen eines Matrigelzusatzes zum Kulturmedium (Maher and Bissell, 1993), warnten jedoch, daß die genaue Zusammensetzung der extrazellulären Matrix nicht bekannt sei und deshalb die Reaktion von Hepatozyten gegenüber Komponenten der extrazellulären Matrix schwierig zu interpretieren sei. Ihr Schluß war, daß die extrazelluläre Matrix Hepatozyten die Möglichkeit verleiht, auf externe Einflüsse zu reagieren. Stamatoglou und

Hughes beschrieben ebenfalls über die Vorteile einer dreidimensionalen Kulturmatrix (Stamatoglou and Hughes, 1994), sie schlossen, daß die Differenzierung der Hepatozyten auf der hohen Ordnung in der histotypischen Morphologie zurückzuführen sei. Auch Ryan et al. demonstrierten den Vorteil eines Sandwich-Systems der extrazellulären Matrix gegenüber einer Zellkultur auf einer basalen Matrix (Ryan *et al.*, 1993). Santhosh und Sudhakaran (Santhosh and Sudhakaran, 1994) berichteten über eine geringere Expression von Zytokeratin-Proteinen im Sandwich-Ansatz, während Block et al. die Reversibilität der Expression von Zytokeratin 19 nach Zusatz von Matrigel zu einer Zellkultur beschrieben. (Block *et al.*, 1996). Auch Burt zeigte die Verbesserung von Zellkultureigenschaften in einer Matrigel-Matrix im Vergleich zu Zellen auf einer Collagen-Matrix (Burt, 1993).

Auch dreidimensionale nichtbiologische Polymere sollen eine Verbesserung der Eigenschaften von Zellkulturen zur Folge haben (Sato *et al.*, 1994). Ähnliche Ergebnisse wurden von Bhadriraju (Bhadriraju and Hansen, 2000) berichtet, die mittels verschiedener Proteine Zellen zur Differenzierung und niedriger DNA-Synthese oder zur Dedifferenzierung mit hoher DNA-Synthese brachten.

Andere Autoren beschrieben eine verbesserte Funktion von Hepatozyten auf Fibronectin: Sudhakaran et al. zeigten eine erhöhte Expression von Albumin gegenüber Kontrollmatrices (Sudhakaran *et al.*, 1986), Sawada et al. eine vermehrte DNA-Synthese (Sawada *et al.*, 1986). Sanchez et al. demonstrierten eine hohe Expression von Albumin sowie einer physiologischen Expression von Zytokeratin 18 auf Fibronectin (Sanchez *et al.*, 2000).

Andererseits beschrieben Pagan et al. eine Dedifferenzierung fetale Hepatozyten auf Fibronectin mit vermehrter Expression von Vimentin (Pagan *et al.*, 1995).

Auch bei Collagen I wurde die Möglichkeit der Verlängerung der Lebensdauer von Hepatozyten demonstriert (Bissell and Choun, 1988; Jauregui *et al.*, 1986; Rana *et al.*, 1994).

Rojkind beschrieb den Einsatz einer aus Rattenlebern gewonnenen Extrazellulärmatrix, die die Expression von Albumin aufrecht erhält (Rojkind *et al.*, 1980).

In unserer eigenen Arbeitsgruppe wurde der Einfluß extrazellulärer Matrixkomponenten auf den Differenzierungszustand von Hepatozytenkulturen bereits anhand mehrerer Modelle untersucht. So wurden Hepatozyten auf Collagen-I, Fibronectin, Laminin, Matrigel und HEM in Kultur gehalten. Im Zuge der Zelldeneration flachten die Hepatozyten ab und bekamen eine typische fibroblastenähnliche Form. Fibronectin bewirkte eine sehr verstärkte Expression von Zytokeratin 18 und *de-novo*-Expression von Zytokeratin 19. Vimentin wurde maximal in einer

auf Collagen-I ausgesäten Zellkultur nachgewiesen. Laminin bewirkte eine geringgradige Vimentin-Synthese und vorübergehende Zytokeratin 18-Veränderungen. Matrigel rief eine starke Zytokeratin 18-Synthese und die erst spät einsetzende *de-novo*-Expression von Zytokeratin 19 und Vimentin hervor. HEM rief eine starke Vermehrung der Zytokeratin 19-Synthese und nur eine niedrige Vimentin-Synthese hervor, Zytokeratin 18 war nur vorübergehend erhöht (Blaheta *et al.*, 1998a; Blaheta *et al.*, 1998b).

## 4.6 Zytoskelett

Das Zytoskelett umfaßt bei tierischen Zellen mehrere verschiedene Proteingruppen. Allen gemeinsam sind Aktin, das Mikrofilamente mit einem Durchmesser von 7 nm bildet, sowie Tubuline, die beispielsweise bei Mitosen eine Rolle spielen und einen Durchmesser von ca. 30 nm haben. Unterschiede bestehen jedoch hinsichtlich der Intermediärfilamente, die einen Durchmesser zwischen 7 und 11 nm haben. Epitheliale Zellen exprimieren die Familie der Zytokeratine, neuronale Zellen die Familie der Neurofilamente, Muskelzellen Desmin und mesenchymale Zellen Vimentin. Jedoch exprimieren verschiedene epitheliale Zellen unterschiedliche Untertypen der Zytokeratine (Denk *et al.*, 1982; Moll *et al.*, 1982). Dabei unterscheiden sich die Zytokeratine von Hepatozyten und biliären Epithelzellen, da Hepatozyten die Zytokeratine 8 und 18, biliäre Epithelzellen hingegen die Zytokeratine 7, 8, 18 und 19 exprimieren. Jedoch bestehen diese Unterschiede nicht im Sinne einer scharfen Trennung, da die zytoskelettalen Marker der Hepatozyten sich bei Regenerationsprozessen der Leber post operationem, in der Folge einer karzinomatösen Entartung (Robrechts *et al.*, 1998; Van Eyken *et al.*, 1988) sowie bei Entstehung einer Zirrhose (Ray *et al.*, 1988; Wells *et al.*, 1997) verändern können.

Fischer *et al.* (Fischer *et al.*, 1995) sowie Terada *et al.* (Terada *et al.*, 1997) berichteten über die Entwicklung der Leber im Verlaufe der Embryogenese und beschrieben embryonale Zellen, die bis zur 10. Gestationswoche die Zytokeratine 8, 18 und 19 exprimierten. Zellen, die später zu Hepatozyten ausdifferenzieren, verloren das Zytokeratin 19, während Zellen, die später zu Gallengängen ausdifferenzieren, es beibehielten und ab der 20. Gestationswoche zusätzlich noch Zytokeratin 7 exprimierten. Im Verlaufe schwerer cholestatischer Prozesse hingegen können Hepatozyten erst Zytokeratin 7, später ebenfalls 19 neoexprimieren.

Ähnliche Prozesse wurden von Alison, Anilkumar und Santhosh gezeigt. Alison *et al.* (Alison,

1998; Alison *et al.*, 1997a; Alison *et al.*, 1997b; Alison *et al.*, 1996) beschrieben dabei, daß „oval cells“ nach Gabe von 2-Azetylaminofluoren proliferieren und die Zytokeratine 8 und 19 exprimieren. Zusätzlich lassen sich Vimentin-Filamente nachweisen. In Verlauf der Zellkulturen können diese Zellen zu Hepatozyten differenzieren, die Zytokeratin 19 sowie Vimentin nicht mehr exprimieren, hingegen große Mengen an Albumin synthetisieren können. Eine hohe Dosis an 2-Azetylaminofluoren kann die Differenzierung jedoch nachhaltig stören und zur Entstehung von Zellen mit intestinaler Morphologie führen. Anilkumar *et al.* (Anilkumar *et al.*, 1995) erwähnten ähnliche Ergebnisse nach Gabe von 2-Azetylaminofluoren, zusätzlich zeigten sie eine Überexpression an Zytokeratin 8 in Hepatozyten, die morphologisch Gallengangsproliferaten ähnelten. Santhosh *et al.* (Santhosh and Sudhakaran, 1994) zeigten, daß in Hepatozyten, die in Collagen-Gelen ausgebracht worden waren, weniger Zytokeratin 8 oder 18 oder Aktin synthetisiert wurde als auf einer singulären Collagen-Schicht. Ähnlich konnten Ray *et al.* (Ray *et al.*, 1988) zeigen, daß die Menge an exprimiertem Zytokeratin mit der Schwere einer alkoholinduzierten Leberfibrose positiv korreliert.

Eigene Ergebnisse zeigen eine deutliche Dedifferenzierung von Hepatozyten im zweidimensionalen gegenüber dem dreidimensionalen Modell. Durchflußzytometrische Analysen von Zytokeratin 8 und 19 zeigen eine Vermehrung von Zytokeratin 8 in einem zweidimensionalen Matrigel-Modell gegenüber einem dreidimensionalen Collagen-I-Modell. Zytokeratin 8 wird am 10. Versuchstag auf Matrigel maximal exprimiert, ein vergleichbares Expressionsmaximum ist in einer dreidimensionalen Kollagen-Matrix nicht nachweisbar. (Abb. 74, 75). Diese Beobachtung wird auch durch Santhosh und Sudhakaran (Santhosh and Sudhakaran, 1994) gestützt, die über eine geringere Expression von Zytokeratinen in Collagen-Gelen gegenüber einer basalen Collagen-Matrix berichteten. Auch Ryan (Ryan *et al.*, 1993). und Mitarbeiter konnten zeigen, daß humane Hepatozyten in einem dreidimensionalen Collagen-Kulturansatz eine höhere Albumin-Produktion gegenüber einem zweidimensionalen Kulturansatz aufwiesen. Hierbei ist möglicherweise der Einfluß der Dreidimensionalität prädominierend gegenüber einer spezifischen Komponente der extrazellulären Matrix, da auch nichtbiologische dreidimensionale Polymere eine Verbesserung der Differenzierung zur Folge haben können (Sato *et al.*, 1994).

Zytokeratin 19 weist ab dem 20. Versuchstag im zweidimensionalen Matrigelmodell eine deutlich höhere Expression als im dreidimensionalen Kollagenmodell auf, übereinstimmend mit Vorergebnissen (Blaheta *et al.*, 1998a; Blaheta *et al.*, 1998b). (Abbildung 76, 77)

Insgesamt kann somit eine stärkere Dedifferenzierung von Hepatozyten im zweidimensionalen Matrigel-Modell gegenüber einem dreidimensionalen Kollagen-Modell angenommen werden.

Die beobachtbaren Werte-Schwankungen sind möglicherweise auf Permeabilisierungsartefakte zurückzuführen, s.a. Nebe et al. (Nebe *et al.*, 1997) und Agelli et al. (Agelli and Halay, 1995).

Eigene Untersuchungen im Western-Blot-Verfahren ergab hierbei nur marginale Unterschiede zwischen den gemessenen Zytokeratinen 8 und 19 respektive dem verwendeten zweidimensionalen Matrigel-Modell und dem dreidimensionalen Collagen-Modell, möglicherweise bedingt durch eine nicht genau bestimmbare Zellzahl vor der Proteinextraktion. (Abb 78, 79)

Haque et al. (Haque *et al.*, 1996) schließen, daß Zytokeratin 19 Entwicklungsstadien von Hepatozyten während der Leberentwicklung definiert und „oval cells“ somit entwicklungsge- schichtliche Stadien während der Differenzierung zu Hepatozyten rekapitulieren.

Weiterhin wurden Veränderungen des Zytoskeletts bei Degenerationsprozessen der Hepatozy- ten in Zellkulturen beschrieben. So konnte Pagan in Hepatozytenkulturen, die auf Collagen- oder Fibronectingelen ausplattiert waren, eine Neusynthese von Vimentin beobachten (Pagan *et al.*, 1995; Pagan *et al.*, 1999). Ähnlich konnten auch Strain et al. (Strain *et al.*, 1995) bei sich vermehrenden Gallengangsepithelien eine Vimentinexpression nachweisen, während Kiassov et al. (Kiassov *et al.*, 1995) bei Ratten bis zum 16. Gestationstag Desmin in Hepatozyten nach- weisen konnten. Eigene Untersuchungen ergaben ebenfalls eine vermehrte Expression von Vimentin in zweidimensionalen Versuchssystemen, in dreidimensionalen Versuchsansätzen nach Zugabe flüssiger extrazellulärer Matrixkomponenten zum Kulturmedium ließ sich eine Ver- minderung der Expression von Vimentin nachweisen.

Sormunen et al. (Sormunen *et al.*, 1993) schließlich wiesen darauf hin, daß die Entwicklung eines Zellskelettes wichtig für die Entwicklung der Zellpolarität und damit der Differenzierung ist

## 4.7 Integrine

Die Integrine entstammen der Superfamilie der Immunglobulin-Rezeptoren (Hynes, 1992) und vermitteln die Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix (Ylaenne, 1990). Es handelt sich bei ihnen um  $\alpha/\beta$ -Heterodimere, wobei mindestens 12  $\alpha$ -Untereinheiten und 9  $\beta$ -Untereinheiten bekannt sind (Cassiman, 1989; Cheresch and Mecham, 1994). Je nach vorkommender  $\beta$ -Unter- einheit unterscheidet man mehrere Untergruppen, so die „very late antigen“ (VLA)-Gruppe, die

durch das Vorkommen einer  $\beta$ 1-Untereinheit gekennzeichnet ist, die Leukozytenintegrine, die eine  $\beta$ 2-Untereinheit aufweisen, und die Zytoadhäsine, die durch eine  $\beta$ 3-Untereinheit gekennzeichnet ist (Yong and Khwaja, 1990).  $\beta$ -Untereinheiten haben eine molekulare Masse von ca. 110 kDa (Cassiman, 1989), die  $\beta$ 1-Untereinheit weist eine große extrazelluläre Domäne, eine membrandurchspannende Formation sowie einen kleinen zytoplasmatischen Teil auf.  $\alpha$ -Untereinheiten weisen eine Masse zwischen 130 und 210 kDa auf, sie bestehen ebenso wie  $\beta$ -Untereinheiten aus einem extrazellulären, einem membrandurchspannenden und einem zytoplasmatischen Teil, weisen aber als Besonderheit  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Domänen im extrazellulären Teil auf, der vermutlich für die Bindung an extrazelluläre Substrate vonnöten ist (Cassiman, 1989).

Bei der Charakterisierung verschiedener Zelltypen fiel die Spezifität des Vorkommens bestimmter Integrine auf. So können differenzierte Hepatozyten die Integrine  $\alpha$ 1 und  $\alpha$ 5 auf der Zellmembran exprimieren, differenzierte biliäre Epithelzellen jedoch  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 6 (Volpes *et al.*, 1991). Abweichend von normalen Expressionsmustern fiel die veränderte Nachweisbarkeit von Integrinen unter bestimmten pathologischen Veränderungen auf, so zum Beispiel die *de-novo*-Expression der gallengangsspezifischen Integrine auf Hepatozyten bei Hepatitis oder Cholestase oder bei maligner Entartung von Hepatozyten (Carloni *et al.*, 1998; Volpes *et al.*, 1993). Steinhoff *et al.* (Steinhoff *et al.*, 1993) berichten über eine *de-novo*-Expression von Integrin  $\alpha$ 2 im Rahmen inflammatorischer Veränderungen, Volpes *et al.* fanden zusätzlich eine Aufregulation der Integrine  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 6 im Rahmen entzündlicher Veränderungen. Eine Expression von  $\alpha$ 2-Integrin wurde durch sie insbesondere im Rahmen cholestatischer Veränderungen beschrieben. Volpes *et al.* konnten weiterhin nachweisen, daß hepatozelluläre Karzinome vermehrt die Integrine  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 6 exprimieren (Volpes *et al.*, 1993), Ozaki *et al.* (Ozaki *et al.*, 1998) fanden zusätzlich noch eine Aufregulierung eines 67 kDa-Laminin-Rezeptors bei dieser Tumorentität. Dies korreliert mit eigenen Ergebnissen, die eine vermehrte Expression der unphysiologischen Integrine  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 6 in Zellkulturen nachwies. Hierbei ergab sich eine Überlegenheit des dreidimensionalen Kollagen-Modells gegenüber dem zweidimensionalen Matrigel-Modell, da die Meßwerte für Integrin  $\alpha$ 2 auf der zweidimensionalen Matrigel-Matrix deutlich schneller anstiegen und höhere Werte als in der dreidimensionalen Kollagen-Umgebung erreichten. Ein Maximum am 5. Versuchstag in der dreidimensionalen Kollagenumgebung fiel bis zum 20. Versuchstag wieder ab, erst in den späten Versuchstagen konnten wieder höhere Werte gemessen werden.

Integrin  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  wurde auf der zweidimensionalen Matrigelmatrix schneller und stärker als in der dreidimensionalen Kollagen-I-Umgebung exprimiert, das Maximum der Meßwerte wurde am 10. Versuchstag erreicht. Unter dreidimensionalen Kulturbedingungen hingegen stiegen die Meßwerte für Integrin  $\alpha 3$  langsam an. (Abb. 80-82)

Ein Vergleich der physiologisch exprimierten Integrine gegenüber den unphysiologisch exprimierten Integrinen  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  zeigt, daß physiologisch exprimierte Integrine, hier beispielsweise Integrin  $\alpha 1$ , deutlich niedrigere Meßwerte aufweist als Integrin  $\alpha 2$ . Der Einfluß der extrazellulären Matrix auf physiologisch und nicht-physiologisch exprimierte Integrine ist hierbei jedoch sehr ähnlich. (Abb 83, 84)

Carloni et al. (Carloni *et al.*, 1998) konnten nachweisen, daß HepG2-Zellen, die einem hepatozellulären Karzinom entstammen, auf Matrigel hohe Werte für  $\alpha 1\beta 1$ -Integrine exprimieren und eine transfizierte Variante, die Integrin  $\alpha 6$  nicht mehr exprimieren kann, ein deutlich vermindertes Wachstum aufweist. Wenig ist jedoch über das Verhalten von Integrinen bei Hepatozytenkulturen und Veränderungen ihres Musters im Rahmen von Degenerationsprozessen bekannt.

Die transmembranären Eigenschaften der Integrine im Zusammenhang mit der Formierung von  $\alpha\beta$ -Heterodimeren legt eine Signaltransduktionsfähigkeit nahe (Teti, 1992), verschiedene Signaltransduktionsmechanismen sind für Integrine beschrieben worden: so beschrieb Sheppard die Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase FAK bei Bindung eines Integrines an sein Antigen (Sheppard, 1996). Hildebrand et al. beschrieben darüber hinaus die Assoziation von FAK mit einem GTPase-bindenden Protein, das die Signalverarbeitung an den Zellkern weiterleitet (Hildebrand *et al.*, 1996). Sie führten weiter aus, daß eine Vielzahl weiterer Wege einschließlich der Phosphorylierung von pp60src, pp59fyn, Csk und Proteinkinase C (PKC)  $\alpha$  und  $\delta$  durch Integrine beeinflußt werden könne. Auch die Bindung der Integrine an verschiedene Bestandteile des Zytoskeletts wie Talin (Ben-Yosef and Francomano, 1999), Aktin (Nebe *et al.*, 1997; Nebe *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1998) und die Zytokeratine (Fontao *et al.*, 1997) sind beschrieben worden, wobei der Aktin-Bindung bei Ito-Zellen ebenfalls eine mögliche Signalwirkung beikomme (Marra *et al.*, 1997). Hierbei bestehe eine mögliche Abhängigkeit von divalenten intrazellulären Kationen, die die Signaltransduktion weiter beeinflussen könne (Nebe *et al.*, 1996). Aus all diesem folgt, daß Integrine auch eine Wirkung auf Differenzierungsprozesse der Zellen haben können (Fischer *et al.*, 1995).

Bei Leukozyten und malignen Epithelien ist auch eine stimulierende Wirkung von Phorbol-Estern auf die Expression von Integrinen nachgewiesen (Aguirre Ghiso *et al.*, 1997; Coppolino *et al.*, 1995; Yong and Khwaja, 1990). Schilddrüsenkarzinome wiesen nach Stimulation mit HGF/SF eine fokale Expression und damit eine Aktivierung von Integrinen auf. (Trusolino *et al.*, 1998)

Eigene Ergebnisse ergaben, daß Prostaglandin E2 (PGE2), stärker noch Phorbolmyristylacetat (PMA), Integrine stimulieren kann, hierbei insbesondere Integrine  $\alpha 2$ . Letzteres stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die über eine vermehrte Aktivierung von Integrin  $\alpha 2$  auf Jurkat-Zellen berichteten (Coppolino *et al.*, 1995). In Kombination mit der Tatsache, daß sich gerade die nicht physiologischerweise auf Hepatozyten vorkommenden Integrine  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  stimulieren ließen, belegt dies eine Retrodifferenzierung der in Zellkultur gehaltenen Hepatozyten zu Zellen, die präsumptiven Stammzellen gleichen. (Abbildung 85-87)

Die maximale Stimulierbarkeit der Integrine  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  war am 5. Versuchstag gegeben, danach nahm die Stimulierbarkeit kontinuierlich ab.  $\alpha 3$ -Integrin hingegen war am 10. Versuchstag maximal stimulierbar.

Ähnlich wie Integrine ließen sich auch die Oberflächenmarker ICAM-I sowie MHC-I und II stimulieren. In eigenen Versuchen ließ sich MHC-I dabei am besten beeinflussen, es zeigte den größten Meßwert unter den gemessenen Oberflächenmarkern und wies eine maximale stimulierte Expression am 10. Versuchstag auf, so daß es sich gut für Verlaufsbeobachtungen der Stimulierbarkeit von Hepatozyten eignet. (Abb. 88)

Physiologischerweise war MHC-II auf Hepatozyten nur in geringer Konzentration vorhanden, mit zunehmender Dedifferenzierung nahm die Expression jedoch zu, insbesondere unter Stimulation mit Interleukin-1 oder Interferon- $\gamma$ . Eine vermehrte Expression kam dabei insbesondere auf zweidimensionalen Matrices gegenüber dreidimensionalen Matrices zum Ausdruck. (Abb. 89, 90), wiederum als Ausdruck einer vermehrten Dedifferenzierung von Hepatozyten in zwei- gegenüber dreidimensionalen Versuchsansätzen.

Nicht-physiologische Integrine wurden frühzeitig exprimiert, sie wiesen auch größere Werte auf als ebenfalls nicht-physiologischerweise exprimiertes MHC-II, sie waren gut stimulierbar und bilden einen guten Marker für die Bestimmung der Dedifferenzierung von Hepatozyten in Zellkulturen (Abb. 91, 92). Weiterhin waren sie ein Hinweis auf eine stattfindende Retrodifferenzierung von Hepatozyten in Richtung Stammzellen, wobei eine klonale Expansion

der dedifferenzierten Zellen derzeit noch nicht belegbar war.

## 5. Ausblick

Die Kultivierung humaner Hepatozyten eröffnet die Möglichkeit einer vereinfachten Versorgung von Patienten mit akuten oder chronischen schweren Leberfunktionsstörungen. Im Rahmen des akuten Leberversagens können Hepatozytentransplantationen und passagere Bioreaktoren das Überleben des Patienten ermöglichen und die Wartezeit bis zur Transplantation überbrücken. Bei metabolischen Dysfunktionen der Leber wie den Glykogenosen könnte die Transplantation genetisch veränderter Hepatozyten die Lebenserwartung des Patienten erhöhen. Zu diesem Zweck ist jedoch die Versorgung mit ausreichenden Mengen an humanen Hepatozyten notwendig, wobei die Differenzierung der zu verwendenden Zellen eine kritische Rolle spielt. Aktuell dedifferenzieren Hepatozyten in Zellkulturen schnell und verlieren ihre synthetischen und metabolisierenden Eigenschaften. Jedoch bestehen verschiedene Ansätze, den Dedifferenzierungsprozeß zu verringern, zu verlangsamen oder gegebenenfalls sogar umzukehren. Verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix können laut Voruntersuchungen einen Einfluß auf die Differenzierung von Hepatozyten haben. Eigene Ergebnisse belegen, daß insbesondere die Verwendung dreidimensionaler Kulturansätze einen positiven Einfluß auf die Differenzierung humaner Hepatozyten aufweist. Eine vermehrte Expression der nicht physiologischerweise in Hepatozyten vorkommenden Zytokeratine 7 und 19 sowie von Vimentin belegen im Zusammenhang mit der Expression der ebenfalls nicht physiologischerweise auf Hepatozyten vorkommenden Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 6$  eine Differenzierung in Richtung einer stammzellenähnlichen Vorläuferzelle, da Hepatozyten im Embryonalstadium die genannten nicht-physiologischen Marker exprimieren können. Von Bedeutung ist hierbei die Expression der nicht-physiologischen Integrine, da diese schneller als intrazelluläre Proteine einen Verlust der Differenzierung anzeigen können. In weiteren Ansätzen könnte beispielsweise die differenzierungsfördernde Wirkung einer Kokultur mit nichtparenchymalen Zellen anhand der Veränderungen des Integrinmusters untersucht und Veränderungen insbesondere zwischen nichtparenchymalen Zellen und Hepatozyten beobachtet werden, um mögliche redifferenzierende Faktoren zu ermitteln. Weiterhin können andere Komponenten der extrazellulären Matrix auf einen möglichen Einfluß hinsichtlich des Integrin-Expressionsmusters untersucht werden, um die immer noch nicht genau bekannte Mikroumgebung der Hepatozyten in der menschlichen Leber zu untersuchen.

## 6. Zusammenfassung

### 1. Zielsetzung

Die menschliche Leber erfüllt im Körper eine Vielzahl von Funktionen. Diese reichen von der Produktion von Blutgerinnungsfaktoren über die Speicherung von Glykogen bis zum Metabolismus von Fremdstoffen. Pro Jahr ereignen sich jedoch mehrere tausend Fälle eines akuten oder chronischen Leberversagens, die häufig nicht anders als durch eine Lebertransplantation beherrschbar sind und häufig im „Tod auf der Warteliste“ enden. Eine adjuvante Maßnahme zur Lebertransplantation stellt die Überbrückung der Wartezeit mit Bioreaktoren oder Hepatozytentransplantationen dar, beide jedoch benötigen große Menge an differenzierten Hepatozyten. Hepatozyten dedifferenzieren jedoch schnell in Zellkulturen, so daß zuverlässige Marker zur Bestimmung des Differenzierungsgrades vonnöten sind.

### 2. Material und Methode

Hepatozyten, die aus menschlichen Gewebeproben isoliert worden waren, wurden verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix ausgesetzt, um zu überprüfen, ob sich ein spezifischer Einfluß einer oder mehrerer Komponenten belegen ließe. Als Marker dienten die zytoskelettalen Marker der Zytokeratine sowie die Oberflächenmarker der Integrine, MHC-I und II sowie ICAM-I, da von diesen Markern Veränderungen im Rahmen entzündlicher, neoplastischer und metabolischer Erkrankungen bekannt sind und weiterhin ein unterschiedliches Expressionsverhalten in embryonalen und adulten Geweben bekannt ist. Integrine, MHC-I und II sowie ICAM-I wurden stimuliert, um die Reaktionsfähigkeit im Laufe der Zellkultur zu erfassen. Untersucht wurden diese Marker mittels Durchflußzytometrie, Western Blot und konfokaler Laserscanmikroskopie.

### 3. Ergebnisse:

In allen Zellkulturen kam es zu Dedifferenzierungserscheinungen mit dem Auftreten unphysiologischer Zytokeratine und unphysiologischer Integrine. Hierbei war das Ausmaß der Dedifferenzierungserscheinungen eher von der Struktur der extrazellulären Matrix als ihrer Zusammensetzung abhängig, so daß unter dreidimensionalen Kulturbedingungen eine bessere Differenzierung als unter zweidimensionalen Bedingungen erzielt wurde.

### 4. Schlußfolgerung:

Humane Hepatozyten dedifferenzieren in Zellkulturen nach Aussaat in verschiedene extra-

zelluläre Matrices. Dabei ist das Ausmaß an Dedifferenzierung weniger abhängig von der Zusammensetzung der Matrix als mehr von der zwei- respektive Dreidimensionalität. Integrine stellen einen interessanten frühen Marker zur Beurteilung der Differenzierung dar und sollten in ergänzenden Experimenten, z. B. Kokultivierung mit nichtparenchymalen Zellen, weiter evaluiert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Agelli M, et al. Flow cytometry and monoclonal antibodies identify normal liver cell populations antigenically related to oval cells. *Eur J Histochem* 1995; 39: 175-82.
- Aguirre Ghiso JA, et al. A phospholipase D and protein kinase C inhibitor blocks the spreading of murine mammary adenocarcinoma cells altering f-actin and beta1- integrin point contact distribution. *Int J Cancer* 1997; 71: 881-90.
- Alison M. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 710-5.
- Alison M, et al. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *J Hepatol* 1997a; 26: 343-52.
- Alison MR, et al. Liver stem cells: when the going gets tough they get going. *Int J Exp Pathol* 1997b; 78: 365-81.
- Alison MR, et al. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* 1996; 110: 1182-90.
- Anilkumar TV, et al. The resistant hepatocyte model of carcinogenesis in the rat: the apparent independent development of oval cell proliferation and early nodules. *Carcinogenesis* 1995; 16: 845-53.
- Bader A, et al. A novel bioreactor design for in vitro reconstruction of in vivo liver characteristics. *Artif Organs* 1995a; 19: 368-74.
- Bader A, et al. Tacrolimus (FK 506) biotransformation in primary rat hepatocytes depends on extracellular matrix geometry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 353: 461-73.
- Bader A, et al. Reconstruction of liver tissue in vitro: geometry of characteristic flat bed, hollow fiber, and spouted bed bioreactors with reference to the in vivo liver. *Artif Organs* 1995b; 19: 941-50.
- Ben-Yosef T, et al. Characterization of the human talin (TLN) gene: genomic structure, chromosomal localization, and expression pattern. *Genomics* 1999; 62: 316-9.
- Ben-Ze'ev A. Control of intermediate filament protein synthesis by cell-cell interaction and cell configuration. *FEBS Lett* 1984a; 171: 107-10.

- Ben-Ze'ev A. Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell- cell contact and cell spreading in cultured epithelial cells. *J Cell Biol* 1984b; 99: 1424-33.
- Ben-Ze'ev A. The relationship between cytoplasmic organization, gene expression and morphogenesis. *TIBS* 1986: 478-481.
- Berry MN, et al. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969; 43: 506-20.
- Bhadriraju K, et al. Hepatocyte adhesion, growth and differentiated function on RGD- containing proteins. *Biomaterials* 2000; 21: 267-72.
- Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol* 1998; 33: 295-302.
- Bissell DM, et al. The role of extracellular matrix in normal liver. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1988; 151: 1-7.
- Blaheta R, et al. Darstellung der Hepatocellulären Intermediärfilamente als Bewertungsmöglichkeit der Leberfunktion. *Transplantationsmedizin* 1998a; 10: 89-93.
- Blaheta RA, et al. Dedifferentiation of human hepatocytes by extracellular matrix proteins in vitro: quantitative and qualitative investigation of cytokeratin 7, 8, 18, 19 and vimentin filaments. *J Hepatol* 1998b; 28: 677-90.
- Block GD, et al. Population expansion, clonal growth, and specific differentiation patterns in primary cultures of hepatocytes induced by HGF/SF, EGF and TGF alpha in a chemically defined (HGM) medium. *J Cell Biol* 1996; 132: 1133-49.
- Bucher O, et al. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Bern: Huber, 1989.
- Burt AD. C. L. Oakley Lecture (1993). Cellular and molecular aspects of hepatic fibrosis. *J Pathol* 1993; 170: 105-14.
- Burt AD, et al. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins in liver biopsies using ultracryomicrotomy and immuno-gold labelling. *Histopathology* 1990; 16: 53-8.
- Busse B, et al. Treatment of acute liver failure: hybrid liver support. A critical overview. *Langenbecks Arch Surg* 1999; 384: 588-99.
- Carloni V, et al. Knockout of alpha6 beta1-integrin expression reverses the transformed phe-

- notype of hepatocarcinoma cells. *Gastroenterology* 1998; 115: 433-42.
- Cassiman JJ. The involvement of the cell matrix receptors, or VLA integrins, in the morphogenetic behavior of normal and malignant cells is gradually being uncovered. *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 41: 19-32.
- Chen SC, et al. Treatment of severe liver failure with a bioartificial liver. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 831: 350-60.
- Cheresh DA, et al. *Integrins : molecular and biological responses to the extracellular matrix.* San Diego: Academic Press, 1994.
- Coppolino M, et al. Inducible interaction of integrin alpha 2 beta 1 with calreticulin. Dependence on the activation state of the integrin. *J Biol Chem* 1995; 270: 23132-8.
- Cressman DE, et al. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6- deficient mice. *Science* 1996; 274: 1379-83.
- Cross DM, et al. A commentary on the use of hepatocytes in drug metabolism studies during drug discovery and development. *Drug Metab Rev* 2000; 32: 219-40.
- Demetriou AA, et al. Artificial hepatic support systems. *Prog Liver Dis* 1995; 13: 331-48.
- Demetriou AA, et al. Replacement of liver function in rats by transplantation of microcarrier-attached hepatocytes. *Science* 1986; 233: 1190-2.
- Denk H, et al. Biochemical and immunocytochemical analysis of the intermediate filament cytoskeleton in human hepatocellular carcinomas and in hepatic neoplastic nodules of mice. *Lab Invest* 1982; 46: 584-96.
- Depreter M, et al. Effects of extracellular matrix on the expression of peroxisomes in primary rat hepatocyte cultures. *J Hepatol* 2000; 32: 381-91.
- Diehl AM, et al. Liver regeneration 3: Regulation of signal transduction during liver regeneration. *Faseb J* 1996; 10: 215-27.
- Falasca L, et al. Retinoic acid treatment induces apoptosis or expression of a more differentiated phenotype on different fractions of cultured fetal rat hepatocytes. *Hepatology* 1998a; 28: 727-37.
- Falasca L, et al. The effect of retinoic acid on the re-establishment of differentiated hepatocyte phenotype in primary culture. *Cell Tissue Res* 1998b; 293: 337-47.

- Fausto N, et al. Liver regeneration. 2. Role of growth factors and cytokines in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995; 9: 1527-36.
- Fischer HP, et al. [Hepatic neoductules]. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1995; 79: 36-46.
- Fontao L, et al. Polarized expression of HD1: relationship with the cytoskeleton in cultured human colonic carcinoma cells. *Exp Cell Res* 1997; 231: 319-27.
- Fox IJ, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-6.
- Francavilla A, et al. Augmenter of liver regeneration: its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* 1994; 20: 747-57.
- Gerlach JC, et al. Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion. *Transplantation* 1994; 58: 984-8.
- Gordon GJ, et al. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000; 156: 607-19.
- Groth CG, et al. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc* 1977; 9: 313-6.
- Gumucio JJ, editor. Hepatocyte heterogeneity and liver function. Bilbao: Servicio Ed. Universidad del Pais Vasco, 1989.
- Haque S, et al. Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab Invest* 1996; 75: 699-705.
- Haralson MA. Extracellular matrix and growth factors: an integrated interplay controlling tissue repair and progression to disease. *Lab Invest* 1993; 69: 369-72.
- Harper AM, et al. The UNOS OPTN waiting list, 1988-1998. *Clin Transpl* 1999: 71-82.
- Hildebrand JD, et al. An SH3 domain-containing GTPase-activating protein for Rho and Cdc42 associates with focal adhesion kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3169-78.
- Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
- James NH, et al. An in vitro model of rodent nongenotoxic hepatocarcinogenesis. *Exp Cell Res* 1992; 203: 407-19.
- Jauregui HO, et al. Attachment and long term survival of adult rat hepatocytes in primary mo-

- nolayer cultures: comparison of different substrata and tissue culture media formulations. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986; 22: 13-22.
- Kiassov AP, et al. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation* 1995; 59: 253-8.
- Kitten O, et al. Mature hepatocytes actively divide and express gamma-glutamyl transpeptidase after D-galactosamine liver injury. *Liver* 1998; 18: 398-404.
- Knop E, et al. Ultrastructural and functional differentiation of hepatocytes under long-term culture conditions. *Anat Rec* 1995; 242: 337-49.
- LaBrecque D. Liver regeneration: a picture emerges from the puzzle. *Am J Gastroenterol* 1994; 89: S86-96.
- Lazaro CA, et al. Generation of hepatocytes from oval cell precursors in culture. *Cancer Res* 1998; 58: 5514-22.
- Lenzi R, et al. Histogenesis of bile duct-like cells proliferating during ethionine hepatocarcinogenesis. Evidence for a biliary epithelial nature of oval cells. *Lab Invest* 1992; 66: 390-402.
- Lilja H. Experimental studies on the effects of hepatocyte-based liver support. Uppsala: Uppsala, Univ, 1998.
- Maher JJ, et al. Cell-matrix interactions in liver. *Semin Cell Biol* 1993; 4: 189-201.
- Maier P. Development of in vitro toxicity tests with cultures of freshly isolated rat hepatocytes. *Experientia* 1988; 44: 807-17.
- Marra F, et al. Integrin-mediated stimulation of monocyte chemotactic protein-1 expression. *FEBS Lett* 1997; 414: 221-5.
- Martinez-Hernandez A, et al. The hepatic extracellular matrix. I. Components and distribution in normal liver. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993a; 423: 1-11.
- Martinez-Hernandez A, et al. The hepatic extracellular matrix. II. Ontogenesis, regeneration and cirrhosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1993b; 423: 77-84.
- Martinez-Hernandez A, et al. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *Faseb J* 1995; 9: 1401-10.
- Martinez-Hernandez A, et al. The extracellular matrix in hepatic regeneration. Localization of

- collagen types I, III, IV, laminin, and fibronectin. *Lab Invest* 1991; 64: 157-66.
- Michalopoulos GK, et al. Hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1992; 15: 149-55.
- Moll R, et al. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.
- Nebe B, et al. Flow cytometric detection of the association between cell surface receptors and the cytoskeleton. *Cytometry* 1997; 28: 66-73.
- Nebe B, et al. Induction of a physical linkage between integrins and the cytoskeleton depends on intracellular calcium in an epithelial cell line. *Exp Cell Res* 1996; 229: 100-10.
- Nyberg SL, et al. Hepatocyte culture systems for artificial liver support: implications for critical care medicine (bioartificial liver support). *Crit Care Med* 1992; 20: 1157-68.
- Omori M, et al. Expression of alpha-fetoprotein and stem cell factor/c-kit system in bile duct ligated young rats. *Hepatology* 1997; 25: 1115-22.
- Ott M, et al. Emerging therapies in hepatology: liver-directed gene transfer and hepatocyte transplantation. *Cells Tissues Organs* 2000; 167: 81-7.
- Ozaki I, et al. Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma. *Gut* 1998; 43: 837-42.
- Pagan R, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cultured neonatal hepatocytes. *Hepatology* 1995; 21: 820-31.
- Pagan R, et al. Effects of growth and differentiation factors on the epithelial- mesenchymal transition in cultured neonatal rat hepatocytes. *J Hepatol* 1999; 31: 895-904.
- Petersen BE, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-70.
- Ponder KP. Analysis of liver development, regeneration, and carcinogenesis by genetic marking studies. *Faseb J* 1996; 10: 673-82.
- Rana B, et al. Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 5858-69.
- Ray MB, et al. Serum vitamin A deficiency and increased intrahepatic expression of cytokeratin antigen in alcoholic liver disease. *Hepatology* 1988; 8: 1019-26.

- Reese JA, et al. Isolation and culture of adult hepatocytes from liver biopsies. *In Vitro* 1981; 17: 935-40.
- Roberts EA, et al. Characterization of human hepatocyte lines derived from normal liver tissue. *Hepatology* 1994; 19: 1390-9.
- Robrechts C, et al. Primary liver tumour of intermediate (hepatocyte-bile duct cell) phenotype: a progenitor cell tumour? *Liver* 1998; 18: 288-93.
- Rojkind M, et al. Connective tissue biomatrix: its isolation and utilization for long-term cultures of normal rat hepatocytes. *J Cell Biol* 1980; 87: 255-63.
- Rozga J, et al. Repeated intraportal hepatocyte transplantation in analbuminemic rats. *Cell Transplant* 1995; 4: 237-43.
- Rozga J, et al. Development of a hybrid bioartificial liver. *Ann Surg* 1993; 217: 502-9; discussion 509-11.
- Runge D, et al. Matrix-mediated changes in the expression of HNF-4alpha isoforms and in DNA-binding activity of ARP-1 in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 259: 651-5.
- Runge D, et al. Serum-free, long-term cultures of human hepatocytes: maintenance of cell morphology, transcription factors, and liver-specific functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 269: 46-53.
- Ryan CM, et al. Isolation and long-term culture of human hepatocytes. *Surgery* 1993; 113: 48-54.
- Saito H, et al. Synthesis and release of Hageman factor (Factor XII) by the isolated perfused rat liver. *J Clin Invest* 1983; 72: 948-54.
- Sanchez A, et al. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J Hepatol* 2000; 32: 242-50.
- Santhosh A, et al. Influence of collagen gel substrata on certain biochemical activities of hepatocytes in primary culture. *Mol Cell Biochem* 1994; 137: 127-33.
- Sarraf C, et al. Cell behavior in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. Light and electron microscopic observations. *Am J Pathol* 1994; 145: 1114-26.
- Sato M, et al. Induction of cellular processes containing collagenase and retinoid by integrin-

- binding to interstitial collagen in hepatic stellate cell culture. *Cell Biol Int* 1998; 22: 115-25.
- Sato Y, et al. A new three-dimensional culture system for hepatocytes using reticulated polyurethane. *Hepatology* 1994; 19: 1023-8.
- Sawada N, et al. Extracellular matrix components influence DNA synthesis of rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* 1986; 167: 458-70.
- Schroder AJ, et al. [Isolation and separation of human adult hepatocytes from resected liver: cellular yield and purity using different methods]. *Zentralbl Chir* 1994; 119: 127-38.
- Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis* 1990; 10: 1-10.
- Schuppan D, et al. Molecules of the extracellular matrix: potential role of collagens and glycoproteins in intestinal adaptation. *Digestion* 1990; 46: 2-11.
- Seglen P, editor. *Preparation of Isolated Rat Liver Cells*. New York: Academic Press, 1976.
- Seglen PO. DNA ploidy and autophagic protein degradation as determinants of hepatocellular growth and survival. *Cell Biol Toxicol* 1997; 13: 301-15.
- Sell S. Electron microscopic identification of putative liver stem cells and intermediate hepatocytes following periportal necrosis induced in rats by allyl alcohol. *Stem Cells* 1997; 15: 378-85.
- Sell S, et al. Maturation arrest of stem cell differentiation is a common pathway for the cellular origin of teratocarcinomas and epithelial cancers. *Lab Invest* 1994; 70: 6-22.
- Sheppard D. Epithelial integrins. *Bioessays* 1996; 18: 655-60.
- Simon-Assmann P, et al. Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* 1995; 51: 883-900.
- Sirica AE. Ductular hepatocytes. *Histol Histopathol* 1995; 10: 433-56.
- Sormunen R, et al. Bile canaliculus formation in cultured HEPG2 cells. *Lab Invest* 1993; 68: 652-62.
- Stamatoglou SC, et al. Cell adhesion molecules in liver function and pattern formation. *Faseb J* 1994; 8: 420-7.
- Steinhoff G, et al. Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: over-

- view on expression patterns of leukocyte receptor and ligand molecules. *Hepatology* 1993; 18: 440-53.
- Stolz DB, et al. Comparative effects of hepatocyte growth factor and epidermal growth factor on motility, morphology, mitogenesis, and signal transduction of primary rat hepatocytes. *J Cell Biochem* 1994; 55: 445-64.
- Strain AJ. Isolated hepatocytes: use in experimental and clinical hepatology. *Gut* 1994; 35: 433-6.
- Strain AJ, et al. Characterization of biliary epithelial cells isolated from needle biopsies of human liver in the presence of hepatocyte growth factor. *Am J Pathol* 1995; 146: 537-45.
- Strom SC, et al. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 39-48.
- Strom SC, et al. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-69.
- Sudhakaran PR, et al. Modulation of protein synthesis and secretion by substratum in primary cultures of rat hepatocytes. *Exp Cell Res* 1986; 167: 505-16.
- Takeishi T, et al. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 1999; 62: 413-22.
- Tateno C, et al. Growth potential and differentiation capacity of adult rat hepatocytes in vitro. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 36-44.
- Tee LB, et al. Dual phenotypic expression of hepatocytes and bile ductular markers in developing and preneoplastic rat liver. *Carcinogenesis* 1996; 17: 251-9.
- Terada T, et al. Normal and abnormal development of the human intrahepatic biliary system: a review. *Tohoku J Exp Med* 1997; 181: 19-32.
- Terry TL, et al. Effects of fetal calf serum and disruption of cadherin function on the formation of bile canaliculi between hepatocytes. *Exp Cell Res* 1994; 214: 642-53.
- Teti A. Regulation of cellular functions by extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: S83-7.
- Traiser M, et al. Isolation and Cryopreservation of Human Hepatocytes. *Transplantationsmedizin* 1994; 6: 84-90.

- Trusolino L, et al. Growth factor-dependent activation of alphavbeta3 integrin in normal epithelial cells: implications for tumor invasion. *J Cell Biol* 1998; 142: 1145-56.
- Uyama S, et al. Delivery of whole liver-equivalent hepatocyte mass using polymer devices and hepatotrophic stimulation. *Transplantation* 1993; 55: 932-5.
- Van Eyken P, et al. Cytokeratin expression in hepatocellular carcinoma: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1988; 19: 562-8.
- Volpes R, et al. Distribution of the VLA family of integrins in normal and pathological human liver tissue. *Gastroenterology* 1991; 101: 200-6.
- Volpes R, et al. Integrins as differential cell lineage markers of primary liver tumors. *Am J Pathol* 1993; 142: 1483-92.
- Watanabe FD, et al. Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. A phase I clinical trial. *Ann Surg* 1997; 225: 484-91; discussion 491-4.
- Wells MJ, et al. Cytokeratin 18 is expressed on the hepatocyte plasma membrane surface and interacts with thrombin-antithrombin complexes. *J Biol Chem* 1997; 272: 28574-81.
- Yin L, et al. Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol. *J Hepatol* 1999; 31: 497-507.
- Ylaenne J. Integrin proteins in the adhesion of human cultured cells to extracellular matrix proteins, 1990.
- Yong K, et al. Leucocyte cellular adhesion molecules. *Blood Rev* 1990; 4: 211-25.
- Zuckerman AJ, et al. Tissue culture of human embryo liver cells and the cytotoxicity of aflatoxin B1. *Br J Exp Pathol* 1967; 48: 20-7.

## **8. Anhang**

### **8.1 Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. A. Encke für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Laborräume.

Herrn PD Dr. med. B. H. Markus möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die gute Betreuung während der Dissertation danken.

Bei Herrn Dr. rer. nat. R. Blaheta möchte ich mich für die vielen Diskussionen sowie seine optimistische Art bedanken, die während der Dissertation eine unerläßliche Hilfe waren.

Den MTAs Frau R. Schröder, E. Oppermann und K. Wilhelm danke ich für die Einweisung in die Laborpraxis und ihre unschätzbare Hilfe bei allen sich während des Laboralltags ergebenden Problemen.

Weiterhin möchte ich dem OP-Personal der Klinik für Allgemein Chirurgie für die Bereitstellung von Lebergewebe danken, ohne das die beschriebenen Versuche nicht hätten stattfinden können.

Zum Schluß möchte ich meiner Familie danken für Geduld, Zuspruch und psychische Hilfe, wenn es mal wieder nicht so klappte, wie es denn eigentlich sollte.

## 8.2 Lebenslauf

### Curriculum vitae

von

### Christoph Schick

geboren am 13.9.1973 in Köln

Vater: Dr. rer. nat Max Schick, Chemiker

Mutter: Hanna Schick, geb. Franke

#### Schulische Ausbildung

1980-1984	Grundschule Biedenkopfer Weg, Frankfurt
1984-1993	Liebigschule Gymnasium der Stadt Frankfurt
5/1993	Abiturprüfung (Abschlußnote 1,0)

#### Medizinische Ausbildung

10/1993	Immatrikulation an der medizinischen Fakultät der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main
8/1995	Ärztliche Vorprüfung (Note 1,66)
4/1995	Famulatur in der Chirurgischen Klinik, Elisabethenkrankenhaus Frankfurt/Main, Direktor Prof. Dr. C. Hottenrott.
8/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
9/1996	Famulatur im Department of General Surgery, LRMC, Landstuhl, Deutschland.

- 4/1997 Famulatur in der kardiologischen Gemeinschaftspraxis Dres. Preusler, Reifart, Störger, Prof. Dr. Schwarz, Frankfurt/Main
- 8/1997 Famulatur im Department of Hepatology, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, UK, unter Leitung von Prof. Elwyn Elias.
- 4/1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,66)
- 4/1999-7/1999 Erstes Tertial des Praktischen Jahres im Zentrum der Chirurgie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main
- 7/1999-12/1999 Zweites Tertial des Praktischen Jahres im Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums der J. W. Goethe-Universität Frankfurt/Main
- 12/1999-3/2000 Drittes Tertial des Praktischen Jahres im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität, Direktor Prof. Dr. Th. J. Vogl
- 4/2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)
- 5/2000 Arzt im Praktikum im Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Klinikums der J. W. Goethe-Universität, Direktor Prof. Dr. Th. J. Vogl.

### **8.3 Ehrenwörtliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die in den Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

#### **Untersuchungen zum Einfluß extrazellulärer Matrixkomponenten auf das Differenzierungsverhalten humaner Hepatozyten unter Berücksichtigung der Veränderungen von Zytoskelett-Proteinen und Oberflächenantigenen.**

im Zentrum der Chirurgie, Klinik für Allgemeinchirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. B.H. Markus ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt, 11.11.2001

Christoph Schick