

"Untersuchungen zur Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen *in vitro* und Transplantation im akut geschädigten Lebermodell"

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Malte Sgodda

geb. am: 08.06.1976 in: Göttingen

Gutachter

1. Prof. Christ

2. Prof. Behrens

3. Prof. Braun

Halle, Juni 2008

Verteidigungsdatum: 05.02.2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 1 |
| Abkürzungsverzeichnis | 4 |
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1 Die Leber | 6 |
| 1.1.1 Aufbau der Leber | 6 |
| 1.1.2 Funktion und Zonierung der Leber | 8 |
| 1.1.3 Lebererkrankungen und Therapie | 9 |
| 1.2 Stammzellen | 11 |
| 1.2.1 Stammzellarten | 11 |
| 1.2.2 Mesenchymale Stammzellen | 11 |
| 1.2.3 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen | 14 |
| 1.2.4 Lebererkrankungen und Regeneration durch Transplantation von Stammzellen | 14 |
| 1.3 Der Wnt Signalweg | 16 |
| 1.3.1 Aktivierung des Wnt Signalweges | 16 |
| 1.3.2 Der kanonische Wnt Signalweg | 17 |
| 1.3.3 Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Differenzierung von Stammzellen | 20 |
| 1.3.4 Der Wnt-Signalweg in der Leber | 21 |
| 1.4 Ziel der Arbeit | 23 |
| 2. Materialien und Methoden | 24 |
| 2.1 Materialien | 24 |
| 2.1.1 Materialien | 24 |
| 2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards | 24 |
| 2.1.3 Geräte | 24 |
| 2.1.4 Bakterienstämme | 25 |
| 2.1.5 Zelllinien | 25 |
| 2.1.6 Versuchstiere | 25 |
| 2.1.7 Antikörper | 26 |
| 2.1.8 Oligonukleotide | 27 |
| 2.1.9 Plasmide | 30 |
| 2.1.10 Kits | 30 |
| 2.1.11 Medien | 31 |
| 2.1.11.1 EM6F | 31 |
| 2.1.11.2. HHMM | 31 |
| 2.1.11.3 HGM | 31 |
| 2.1.11.4 Osteogenes Differenzierungsmedium (ODM) | 32 |
| 2.1.11.5 Adipogenes Differenzierungsmedium (ADM) | 32 |
| 2.1.11.6 Krebs-Ringer Puffer (1 x KRP) | 32 |
| 2.1.11.7 Präperfusionspuffer | 32 |
| 2.1.11.8 Collagenase-Perfusionspuffer | 32 |
| 2.1.11.9 Waschpuffer | 33 |
| 2.1.11.10 Einsaatmedium für Hepatozyten | 33 |
| 2.2 Methoden | 33 |
| 2.2.1 Zellbiologische Methoden | 33 |
| 2.2.1 Isolierung von Hepatozyten aus der Ratte | 33 |
| 2.2.2 Isolierung von Hepatozyten aus der Maus | 34 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.3 Transplantation von Stammzellen in die Ratte | 34 |
| 2.2.4 Transplantation von Stammzellen in die Maus | 35 |
| 2.2.5 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe | 35 |
| 2.2.6 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark..... | 36 |
| 2.2.7 Fluoreszenz-Aktivierte Durchflusscytometrie (FACS) | 36 |
| 2.2.8 Hepatogene Differenzierung von Stammzellen..... | 37 |
| 2.2.9 Osteogene und adipogene Differenzierung | 37 |
| 2.2.10 Biochemische und molekularbiologische Methoden..... | 37 |
| 2.2.10 Herstellung von Lentiviren | 37 |
| 2.2.11 Lentivirale Infektion von Zellen | 38 |
| 2.2.12 Fluorometrische Messungen | 38 |
| 2.2.13 Aktivierung des PCK Promotors mittels cAMP nach transienter Transformation..... | 39 |
| 2.2.14 Bestimmung der Harnstoffsyntheserate..... | 40 |
| 2.2.15 Klonierung des Lentivirus | 40 |
| 2.2.16 RT-PCR..... | 43 |
| 2.2.17 Zellyse und Proteinbestimmung | 44 |
| 2.2.18 SDS-PAGE | 44 |
| 2.2.19 Histologische Methoden | 45 |
| 2.2.19 Periodic Acid-Schiff's Staining (PAS) | 45 |
| 2.2.20 Sudan III Färbung | 45 |
| 2.2.21 Alizarin-Red-S Färbung | 46 |
| 2.2.22 Immunocytochemie..... | 46 |
| 2.2.23 Immunhistochemische Färbungen..... | 47 |
| 2.2.24 Enzymatischer CD26 Nachweis..... | 47 |
| 3. Ergebnisse | 49 |
| 3.1 Leberregeneration mit mesenchymalen Stammzellen aus dem peritonealen Fettgewebe der Ratte im syngenem Transplantationsmodell..... | 49 |
| 3.1.1 Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus dem peritonealen Fettgewebe der Ratte. | 49 |
| 3.1.2 Funktionalität von <i>in vitro</i> hepatogen differenzierten rAT- <i>MSC</i> | 51 |
| 3.1.3 Transplantation und funktionelle Integration von rAT- <i>MSC</i> in Rattenlebern | 58 |
| 3.1.4 Quantifizierung der hepatischen Repopularisierung durch rAT- <i>MSC</i> | 61 |
| 3.2 Leberregeneration mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe im xenogenen Mausmodell..... | 63 |
| 3.2.1 Isolierung und Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen (h <i>MSC</i>) aus dem Fettgewebe im Vergleich zu h <i>MSC</i> aus dem Knochenmark | 63 |
| 3.2.2. Plastizität der h <i>MSC</i> aus verschiedenen Gewebetypen | 65 |
| 3.2.3 Hepatogene Differenzierung von hBM- <i>MSC</i> , phAT- <i>MSC</i> und shAT- MSC | 67 |
| 3.2.4 Funktionalität von hepatogen <i>in vitro</i> differenzierten h <i>MSC</i> | 70 |
| 3.2.5 Transplantation von h <i>MSC</i> aus dem Fettgewebe im xenogenen Mausmodell..... | 74 |
| 3.2.6 Quantifizierung der hepatischen Repopularisierung durch differenzierte und undifferenzierte hAT- <i>MSC</i> | 78 |
| 3.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung..... | 83 |
| 3.4 Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalweges auf die hepatogene Differenzierung von hAT- <i>MSC</i> | 87 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.1. Die Translokation des β -Catenin in den Zellkern während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC | 87 |
| 3.4.2 Lokalisation des β -Catenin im Zellkern in Abhängigkeit von der Aktivität der Kinase GSK3 beta | 89 |
| 3.4.3 TCF/Lef-vermittelte Transkription während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC | 93 |
| 3.4.4 Einfluss des Hemmstoffes BIO auf die hepatozytäre Differenzierung sowie auf Komponenten des Wnt/ β -Catenin Signalweges und seiner Zielgene in hAT-MSC | 97 |
| 4. Diskussion: | 101 |
| 4.1 Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe – Eigenschaften und Vergleich | 101 |
| 4.2 Hepatogene <i>in vitro</i> Differenzierung mesenchymaler Stammzellen..... | 102 |
| 4.3 Hepatogene <i>in vivo</i> Differenzierung mesenchymaler Stammzellen | 105 |
| 4.4 Beteiligung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs an der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC | 109 |
| 4.5 Einfluss des β -Catenins auf den Phänotyp hepatogen differenzierter hAT-MSC | 111 |
| 5. Zusammenfassung | 116 |
| 6. Literaturverzeichnis | 118 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| AFP | Alpha Fetoprotein |
| Alb | Albumin |
| APC | Adenomatöse Polyposis Coli Protein |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| AT-MSC | Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell |
| BIO | (2_Z,3_E)-6-bromoindirubin-3_-oxime |
| BSA | Bovines Serum Albumin |
| CD | Cluster Designation |
| CIAP | Calf Intestinal Alkaline Phosphatase |
| CPS | Carbamoylphosphatsynthetase |
| CK | Cytokeratin |
| CX | Connexin |
| CYP | Cytochrom P450 |
| d | day |
| DAPI | 4'_6-Diamidino-2-phenylindole |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DMEM-H/LG | Dulbecco's Modified Eagle Medium – High/Low Glucose |
| Dsh | Dishevelled |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| EGF | Epidermal Growth Factor |
| EM6F | Erhaltungsmedium mit 6 Faktoren |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FFL | Firefly Luciferase |
| FITC | Fluoreszeinisothiocyanat |
| FoxM1 | Forkhead transcription factor FoxM1B |
| Fzd | Frizzled |
| GAPDH | Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase |
| GFP | Green Fluorescent Protein |
| GSK | Glykogensynthase-Kinase |
| hAT-MSC | Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell |
| hBM-MSC | Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HGM | Hepatocyte Growth Medium |

| | |
|---------------|---|
| HHMM | Human Hepatocyte Maintenance Medium |
| HSC | Hematopoietic Stem Cell |
| IgG | Immunglobulin G |
| IMP-1 | IGF II mRNA-binding Protein 1 |
| Lef-1 | Lymphoid Enhancer Factor-1 |
| LPL | Lipoprotein lipase |
| MEM | Minimal Essential Medium |
| MSC | Mesenchymal Stem Cell |
| nd | nicht differenziert |
| OC | Osteocalcin |
| ON | Osteonectin |
| PCK | Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PE | Phycoerythrin |
| PEG | Polyethylenglycol |
| phAT-MSC | Peritoneal Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell |
| PPAR | Peroxisome Proliferator-Activated Receptor |
| rAT-MSC | Rat Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell |
| RFU | Relative Fluorescent Units |
| RT-PCR | Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| Ser | Serin |
| shAT-MSC | Subcutaneous Human Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cell |
| α -SMA | alpha-smooth muscle actin |
| TCF | T-Cell Factor |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin |
| TFN | Transferrin |
| β -TrCP | Beta Transducin repeat Containing Protein |
| Tyr | Tyrosin |
| Ub | Ubiquitin |
| wt | Wildtyp |

1. Einleitung

1.1 Die Leber

1.1.1 Aufbau der Leber

Mit etwa 2 % der Körpermasse und einem Gewicht von 1,5-2 kg ist die Leber eines der größten Organe im menschlichen Körper. Die Leber wird grob in zwei große Leberlappen unterteilt. Der größere, rechte Leberlappen liegt im rechten Oberbauch und ist teilweise mit dem Zwerchfell verwachsen, der linke, kleinere Leberlappen reicht bis in die linke obere Bauchhöhle hinein. Aufgrund ihrer Gefäßanordnung werden die beiden Leberlappen in acht Segmente unterteilt. Die zuführenden Blutgefäße (Leberarterie und Pfortader) sowie der Hauptgallengang befinden sich caudal. Durch die Pfortader gelangt das venöse Blut aus dem großen Körperkreislauf in die Leber. In den Lebersinusoiden werden Nährstoffe, Fremdstoffe und Metabolite aus dem Magen-Darm-Trakt im Leberparenchym durch die Hepatozyten aufgenommen und verstoffwechselt. Syntheseprodukte, wie z.B. Plasmaproteine und Energiesubstrate werden in das Blut abgegeben. Cranial münden die Verzweigungen in die Lebervene, die dann in die große Hohlvene übergeht (Abb. 1).

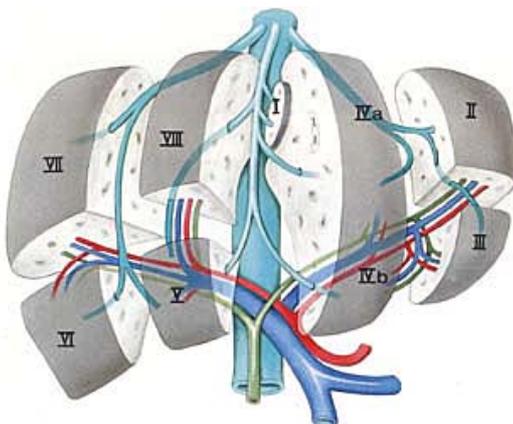


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der menschlichen Leber. Die Leber besteht aus zwei Leberlappen, die insgesamt in acht Segmente unterteilt werden. Die Pfortader, die Leberarterie und der Gallengang befinden sich caudal. Durch die Hohlvene gelangt das Blut cranial zurück in den Blutkreislauf (Quelle: Universitätsklinikum Giessen/Marburg).

Die beiden Leberlappen sind histologisch in 1-2 mm³ große, hexagonale Leberläppchen unterteilt, die vorwiegend aus in Balken angeordneten Hepatozyten bestehen. An den Eckpunkten dieser Hepatozytenbalken liegen die Periportalfelder, bestehend aus einem Ast der Leberarterie, einem Ast der Pfortader und einem Gallengang, die als Glisson'sche Dreiecke (Abb. 2) bezeichnet werden. Zwischen den Hepatozyten befinden sich die Lebersinusoiden, die mit einem einzelligen Endothel ausgekleidet sind. In den Sinusoiden liegen die Kupfferschen Sternzellen, zwischen den Hepatozyten und Endothelien (Disse'sche Raum) liegen die Itozellen. Die Endothelien der Sinusoide sind fenestriert und ermöglichen einen optimalen Stoffaustausch zwischen Blut und Hepatozyten. Die Gallenflüssigkeit wird über einen doppelten Hepatozytenbalken, die Gallenkanälchen, die über kein eigenes Epithel verfügen, in den Gallengang abtransportiert. Beim Austritt aus dem Parenchym gehen die Gallenkanälchen in die mit einem Epithel ausgekleideten Hering-Kanäle und schließlich in den extralobulären Gallengang über. Diese vereinigen sich zum Ductus choledochus, der die Galle schließlich in die Gallenblase überführt.

Im Bereich der Hering'schen Kanäle ist auch das Stammzellreservoir der Leber zu finden, das für die Bildung von sogenannten Ovalzellen verantwortlich ist. Diese Ovalzellen können im akuten Leberversagen rekrutiert werden, indem sie an dem Aufbau eines neuen Leberparenchyms beteiligt sind oder durch chemisch induzierte Karzinogenese aktiviert werden (1). Die Oval-Zellen sind dabei nur in einem kurzen Zeitraum von wenigen Tagen und nicht während der gesamten Regenerationszeit im Tiermodell zu beobachten (2).

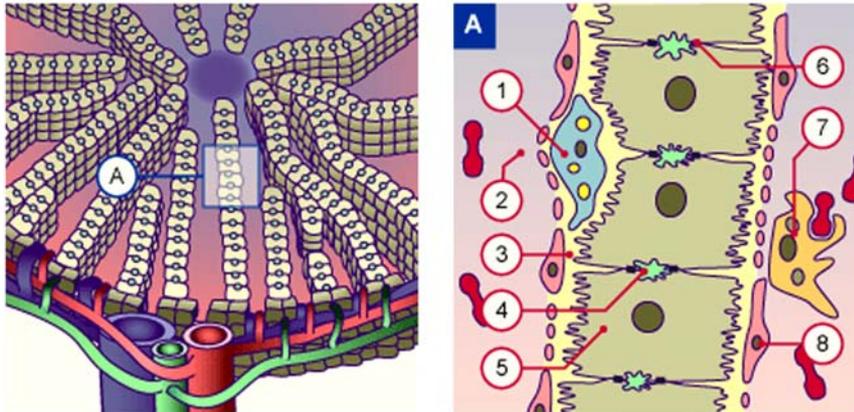


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Leberläppchen. Über die Leberarterie und die Pfortader gelangt das Blut zu den Hepatozyten und wird über die Zentralvene wieder abgeführt. Die Gallenflüssigkeit fließt dem Blutstrom entgegen und wird über die Gallenkanälchen und den Gallengang in die Gallenblase geführt. Die Kupfferschen Sternzellen liegen in den Lebersinusoiden und stellen die Makrophagen der Leber dar (1 Itozellen, 2 Sinusoidaler Raum, 3 Disse'scher Raum, 4 Gallenkanälchen, 5 Hepatozyt, 6 Tight-Junction, 7 Kupffer'sche Sternzelle, 8 Sinusoidale Endothelzelle, Quelle: www.embryology.ch).

1.1.2 Funktion und Zonierung der Leber

Die Leber dient der Entgiftung körperfremder (Xenobiotika, z. B. Medikamente, Umweltgifte) und körpereigener (Endobiotika, z. B. Steroidhormone, Blutfarbstoffe) Substanzen des Blutes. Weiterhin wird in der Leber der aus dem Darm aufgenommene und im Aminosäurestoffwechsel anfallende Ammoniak zu Harnstoff umgewandelt. Als zentrales Stoffwechselorgan ist die Leber eng in den Eiweiß-, Fett- und Glukosestoffwechsel eingebunden. Sie speichert bei hohem Nährstoffangebot z. B. Glukose in Form von Glykogen und setzt bei Nahrungskarenz die Glukose wieder frei. Zusätzlich wird über die Glukoneogenese Glukose bereitgestellt. Die Hormone Insulin und Glukagon sind dabei Gegenspieler der Synthese und des Glykogenabbaus. Zudem ist die Leber für die Synthese von Plasmaproteinen wie Albumin, Globulinen, Gerinnungsfaktoren, Akut-Phase-Proteinen und Proteinen des Komplementsystems zuständig. Die Lipoproteinsynthese in der Leber ist wesentlicher Bestandteil des Austausches von Cholesterin zwischen den Organen. Als blutbildendes Organ der Embryonalentwicklung versorgt die Leber den Fetus bis zum 7. Schwangerschaftsmonat mit Blut. Die verschiedenen Stoffwechsel- und Syntheseleistungen der Leber sind nicht in allen Hepatozyten gleich. Aufgrund eines

auf dem Blutweg entlang der Sinusoide entstehenden Konzentrationsgradienten an Substraten, Hormonen, Zytokinen und insbesondere von Sauerstoff ergibt sich eine Zonierung der metabolischen Leistungen von den periportal (um die Portalvene gelegenen) zu den perivenösen (um die Zentralvene gelegenen) Hepatozyten im Leberparenchym (3-5). Während z. B. in den in periportal (um die Portalvene gelegenen) Hepatozyten die Harnstoffsynthese, Gluconeogenese und der Glycogenabbau zu Glucose erfolgt, wird in den perivenösen Hepatozyten Ammoniak durch die Glutaminsynthetase fixiert und Glukose und Glykogen durch den Vorgang der Glykolyse zu Lactat abgebaut. Auch findet der Xenobiotikastoffwechsel überwiegend in den perivenösen Hepatozyten statt (3). Entsprechend ist es möglich, periportale und perivenösen Hepatozyten anhand ihres Genexpressionsmusters zu unterscheiden. Als Marker für periportale Hepatozyten gilt die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK), das Kontrollenzym der Gluconeogenese. Als Marker für perivenöse Hepatozyten dagegen gilt die in nur 1-2 Zellschichten um die Zentralvene herum exprimierte Glutaminsynthetase (GS).

1.1.3 Lebererkrankungen und Therapie

Jedes Jahr sterben weltweit Millionen Menschen an Lebererkrankungen, die durch Autoimmunreaktionen (6), maligne Transformationen (7), Infektionen (8), genetische Defekte (9) oder sekundär z. B. durch lebertoxische Substanzen (10) ausgelöst werden. Eine Lebertransplantation ist bei akutem Leberversagen die einzige Therapieoption. Diese ist jedoch ein invasiver Eingriff und erfordert postoperativ eine lebenslange Behandlung mit Immunsuppressiva. Zudem reicht die Zahl der zur Verfügung stehenden Transplantate bei weitem nicht aus, um der Nachfrage gerecht zu werden (Abb. 3). Daher müssen Alternativen zur Organtransplantation etabliert werden. Eine Möglichkeit ist die Hepatozytentransplantation, bei der die Zellen aus „marginalen“ Spenderorganen, die nicht für Transplantationen geeignet sind, isoliert werden und in die Empfängerleber transplantiert werden. Allerdings werden heute zum Teil auch „marginale“ Spenderorgane transplantiert, so dass die Quantität und die Qualität der Hepatozyten aus den dann noch verfügbaren Lebern gering ist. In der Regel werden die Hepatozyten kryokonserviert gelagert, was die Vitalität (11) und die Fähigkeit zur Integration im Empfängerorgan (12) weiter vermindert. Es ist auch nicht möglich, die Hepatozyten alternativ bis zur Transplantation *in vitro* zu kultivieren, da ihre metabolischen Fähigkeiten *in vitro* schnell zurückgehen (13, 14).

Diese Schwierigkeiten machen es notwendig, Alternativen zur therapeutischen Verwendung ausdifferenzierter Hepatozyten bei Lebererkrankungen zu finden. Eine Möglichkeit ist die Differenzierung von adulten Stammzellen zu Hepatozyten. Ihre Nutzung hat gegenüber der Verwendung embryonaler Stammzellen eine geringere ethische Bedenklichkeit. Zudem lassen sie sich leicht kultivieren und *in vitro* expandieren. Sie können aus verschiedenen Geweben des Menschen isoliert werden und eignen sich sowohl für die autologe als auch allogene Stammzelltherapie.

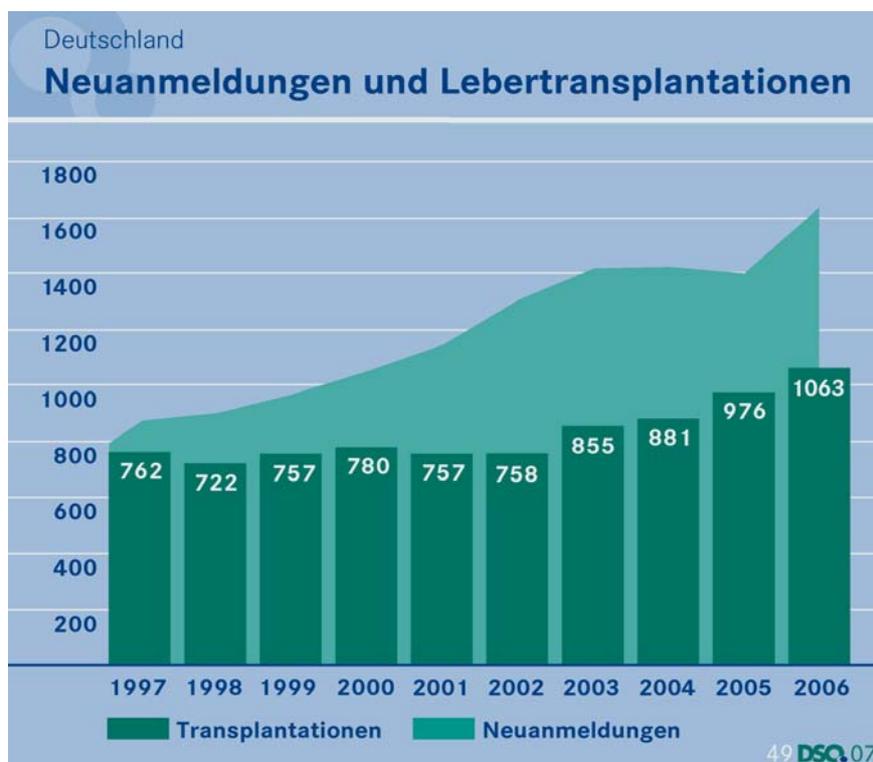


Abbildung 3: Die Anzahl der in Deutschland auf der Warteliste stehenden Patienten übersteigt die Anzahl der durchgeführten Lebertransplantationen (Quelle: DSO, 2007).

1.2 Stammzellen

1.2.1 Stammzellarten

Stammzellen werden entsprechend ihrer Differenzierungsfähigkeit in zwei Gruppen unterteilt: embryonale und adulte Stammzellen. Embryonale Stammzellen sind pluripotente Zellen, die experimentell aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isoliert werden (15). Adulte Stammzellen kommen als undifferenzierte Zellen im differenzierten Gewebe vor und dienen dort der Regeneration von erkranktem oder verletztem Gewebe. Adulte Stammzellen sind sich selbst erneuernde, multipotente Zellen. Sie sind generell in der Lage, sich in Zellen der Keimblattlinie zu differenzieren, aus der sie stammen. Die am häufigsten untersuchte Art adulter Stammzellen sind die hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*, HSC). Die HSC können aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut gewonnen werden. Diese Stammzellen sind primär für die Bildung der roten und weißen Blutkörperchen im Knochenmark zuständig. Diverse Untersuchungen haben gezeigt, dass HSC sowohl in hämatopoetische als auch in nicht-hämatopoetische Linien wie skeletale Muskelzellen (16, 17), neuronale Zellen (18, 19), Nieren- und Lungenzellen (20, 21) sowie Leberzellen (22-24) *in vitro* und teilweise auch *in vivo* zu differenzieren sind. Die Häufigkeit dieser Zellen ist gering und beträgt etwa 1:10.000 im Knochenmark und 1:100.000 im peripheren Blut. Neben der schwierigen Gewinnung von homogenen HSC-Populationen und ihrer schwierigen Kultivierbarkeit, zeigen diese Stammzellen auch ein hohes Potential zur Fusion mit anderen Zellen. So hat die Transplantation von humanen HSC in Mauslebern Zellfusionen gezeigt (25-27), bei denen die Zellkerne der Empfänger-Hepatozyten positiv für das humane Genom und das Genom des Empfängertieres waren.

1.2.2 Mesenchymale Stammzellen

Neben den HSC sind in verschiedenen Gewebetypen die mesenchymalen Stammzellen (*mesenchymal stem cells* MSC) zu finden. Die MSC wurden zum ersten Mal von Friedenstein 1968 beschrieben. Sie wurden als klonale, Fibroblasten ähnliche Zellen mit der Fähigkeit zur ‚Plastizität‘ beschrieben, d.h. der Fähigkeit, sich osteogen, adipogen und chondrogen zu differenzieren (28). Diese Zellen wurden zunächst als *colony forming units* (CFU) beschrieben, erst später wurden sie als mesenchymale Stammzellen klassifiziert. Die MSC sind ebenfalls sich selbst

erneuernde Zellen. Sie sind in der Lage, unter Beibehalt ihres MSC-Charakters über viele Passagen hinweg zu proliferieren, ohne ihre Differenzierungsfähigkeit zu verlieren (29). Neben dem Vorkommen im Knochenmark (30) und dem peripheren Blut (31) können MSC auch aus Nabelschnurblut (32), der Plazenta (33), Haarfollikeln (34), dem Fruchtwasser (35), fetalem Gewebe (36) und Fettgewebe (37) isoliert werden. Sie zeigen multipotentes Differenzierungsverhalten und können *in vitro* und teilweise auch *in vivo* chondrogen, adipogen, osteogen, hepatogen, neuronal und myogen differenziert werden.

MSC lassen sich durch ihre Fähigkeit zur Plastikadhärenz einfach isolieren und propagieren. Sie zeigen eine spindelförmige Morphologie und bilden schnell große Kolonien. Daneben wurden MSC aber auch als breite, abgeflachte Zellen beschrieben, die kleine Kolonien bilden und deren Teilungsrate geringer ist (38). MSC sind durch die Expression bzw. Nicht-Expression bestimmter Oberflächenmarker charakterisiert (39, 40). Allerdings ist derzeit kein Marker bekannt, der ausschließlich auf MSC exprimiert wird. Daher ist eine kombinierte Expressionsanalyse von verschiedenen Markern notwendig, die in dieser Zusammensetzung nur auf MSC vorkommen. Die fehlenden Oberflächenantigene CD14 (CD14 antigen), CD34 (*Hematopoietic progenitor cell antigen 1*, HPCA1) und CD45 (*lymphocyte phosphatase associated phosphoprotein*, LPAP) unterscheiden die MSC von den HSC, die diese exprimieren. Hingegen exprimieren MSC unter anderem die Marker CD13 (Aminopeptidase N), CD29 (Integrin beta 1) und CD44 (GP90 *lymphocyte homing/adhesion receptor*), die wiederum nicht auf HSC zu finden sind, dafür aber auf vielen Zellen des lymphatischen Systems. Tabelle 1 gibt einen Überblick darüber, welche Oberflächenantigene von MSC exprimiert bzw. nicht exprimiert werden.

Die Stammzellen kommen im Gewebe in den so genannten Stammzellnischen vor, einer spezifischen Mikroumgebung, die das Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotential aufrechterhält. Diese Nischen existieren während des gesamten Lebens eines Organismus. Die Mikroumgebung der Stammzellnische wird dabei von den Stammzellen und deren umgebende Zellen durch die Sekretion spezifischer Faktoren und der Bildung einer Extrazellulärmatrix geschaffen (41). Auch die Auswanderung der Stammzellen aus der Nische und ihre Differenzierung werden über spezifische Faktoren reguliert, die größtenteils unbekannt sind. In den Ovarien bei *Drosophila* befindet sich in der Extrazellulärmatrix am Nischenrand eine

erhöhte Konzentration von DE-Cadherin und Armadillo (β -Catenin in den Vertebraten), welches für die Aufrechterhaltung von Zell-Zell Kontakten zuständig ist. Während der Oogenese kommt es durch Umverteilung des Armadillo in den Zellkern zum Verlust des DE-Cadherins, so dass Zell-Zell Kontakte aufgehoben werden und Keimbahnstammzellen die Nische verlassen (42).

| stark exprimierte Antigene | | | nicht-/schwach exprimierte Antigene | | |
|----------------------------|------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------|
| CD | Expression | Referenz | CD | Expression | Referenz |
| 13 | ++ | (37, 43-49) | 3 | -- | (45, 49) |
| 29 | ++ | (30, 44, 45, 47-53) | 4 | -- | (45, 49, 52) |
| 44 | ++ | (30, 37, 44-50, 52-54) | 11a | -- | (49, 52) |
| 49a | ++ | (49) | 11b | -- | (44, 47, 52, 53, 55) |
| 49b | ++ | (49, 52) | 11c | -- | (45, 52) |
| 49c | ++ | (49) | 14 | -- | (37, 44, 45, 48-50, 53, 56) |
| 49d | ++ | (37, 45, 48, 52) | 15 | -- | (45, 49) |
| 49e | ++ | (47-49, 52) | 18 | -- | (49, 52, 53) |
| 49f | ++ | (49) | 21 | -- | (49) |
| 51 | ++ | (30, 46, 48, 49, 52) | 31 | -- | (37, 45, 49, 52, 56) |
| 54 | ++ | (45, 48, 49) | 34 | -- | (37, 44, 48-50, 53, 56) |
| 71 | ++ | (30, 37, 49) | 36 | -- | (48, 49, 53) |
| 73 | ++ | (49, 53, 56) | 38 | -- | (45, 49) |
| 90 | ++ | (30, 37, 43, 45-47, 49-53, 55) | 45 | -- | (37, 43-45, 47-50, 53-56) |
| 102 | ++ | (49) | 49d | -- | (37, 48, 49) |
| 105 | ++ | (37, 43-45, 49-51, 54, 56) | 49d | +/- | (45, 52) |
| 106 | ++ | (30, 37, 44, 45, 48, 49, 52, 53) | 62e | +/- | (37, 49, 52) |
| 120a | ++ | (30, 49) | 62p | +/- | (45, 52) |
| 120b | ++ | (49) | 62l | +/- | (49, 52) |
| 123 | ++ | (49) | 80 | +/- | (49, 56) |
| 124 | ++ | (49) | 82 | +/- | (49, 56) |
| 126 | ++ | (30, 49) | 117 | +/- | (49, 52) |
| 127 | ++ | (49) | 133 | +/- | (48, 49, 52) |
| 166 | ++ | (44, 49, 56) | HLA-DR | +/- | (44, 47, 48, 50-52, 57) |
| 140 | ++ | (49, 52) | | | |
| HLA-ABC | ++ | (47-49, 52) | | | |

Tabelle 1: Expression von Oberflächenantigenen auf mesenchymalen Stammzellen.

1.2.3 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Werden mesenchymale Stammzellen aus dem Gewebe isoliert, führt die Entnahme aus der physiologischen Mikroumgebung der Stammzellnische unter Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien zur Veränderung der Expression einer Vielzahl von Genen (52, 56). Insbesondere die Wachstumsfaktoren (FGF 2, 6, 7), deren Rezeptoren (FGFR3 und TGF β R), Zelladhäsionsmoleküle (Integrin α 5, 11, β 1) und Gene der osteogenen Differenzierung (Osteonectin, Osteopontin) zeigen deutlich erhöhte Expressionen. Zudem ist die Expression von Chemokinrezeptoren (CC und CXC Motiv) deutlich erhöht (58). Trotz dieser Veränderungen behalten die MSC aber weiterhin ihren multipotenten Stammzellcharakter. Selbst wenn es zu einer spontanen, ungerichteten Differenzierung kommt, sind die Stammzellen in Gegenwart entsprechender Faktoren noch zur gerichteten Differenzierung befähigt (59-61). Zu den am häufigsten verwendeten Faktoren, die die hepatogene Differenzierung begünstigen, gehören der *epidermal growth factor* (EGF), der *hepatocyte growth factor* (HGF) und die *fibroblast growth factors* (FGF 1-4).

Dabei variieren Konzentrationen und Kombinationen der genannten Wachstumsfaktoren erheblich von Studie zu Studie. Den Studien ist allerdings gemeinsam, dass der Einsatz dieser Faktoren essentiell für die Differenzierung der Stammzellen ist (39, 52, 62-64). Bei der hepatogenen Differenzierung von MSC geht die Zunahme der Expression hepatozytenspezifischer Gene wie der PCK1 und des beim Menschen leberspezifischen Cytochroms P450 Typ 3A4 (CYP3A4) mit dem Verlust der Expression von Hepatozytenvorläufergenen wie *smooth muscle actin* (SMA) oder Cytokeratin 7 (CK7) einher. Auch die Fähigkeit zur Glykogenspeicherung zeigt die hepatozytäre Differenzierung an. Insgesamt sind die molekularen Mechanismen, die zur Differenzierung von Stammzellen führen, bisher nur in Ansätzen geklärt. Verschiedene Untersuchungen legen jedoch die Vermutung nahe, dass der Wnt-Signalweg in der Differenzierung involviert ist (65, 66).

1.2.4 Lebererkrankungen und Regeneration durch Transplantation von Stammzellen

In verschiedenen syngen (67, 68), allogenen (69) oder xenogenen (44, 70) Transplantationen mit unterschiedlichen Stammzellarten konnte der Nachweis der Integration von transplantierten Stammzellen erbracht werden. Die integrierten Zellen wurden meistens 4-12 Wochen nach Transplantation in der Empfängerleber

nachgewiesen. Für die effiziente Integration und Proliferation der transplantierten Zellen in der Empfängerleber ist es notwendig, einen Wachstumsreiz zu induzieren, und den transplantierten Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Wirtshepatozyten zu verschaffen. Experimentell kann dazu das Modell der Leberregeneration nach Entfernung von ca. 30 % der Lebermasse (1/3 Hepatektomie) verwendet werden. Durch die Vorbehandlung der Tiere mit Pyrrolizidin-Alkaloiden wie Retrosin bei Ratten bzw. Monocrotalin bei Mäusen (71) erhalten die transplantierten Zellen einen Wachstumsvorteil. Diese Substanzen werden in den Wirtshepatozyten durch das Cytochrom P450-System zu Dehydroretronecin bzw. Dehydromonocrotalin als Zwischenprodukt umgesetzt. Beide Metabolite können durch Abspaltung einer OH-Gruppe in ein mesomeriestabiles Kationen überführt werden, die dann mit den Amino-, Hydroxyl- und Sulfhydryl-Gruppen der DNA und Proteinen reagieren. Durch die Bindung an die DNA in den Hepatozyten kommt es zu einer G0-G1 Arretierung des Zellzyklus.

Klinisch sind akutes und chronisches Leberversagen häufige Lebererkrankungen, die u. a. durch akute Intoxikation, Infektion durch Viren oder Autoimmunerkrankungen induziert werden. Im Tiermodell können chronische Lebererkrankungen durch die Verabreichung von Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄) oder Allylalkohol, akutes Leberversagen durch die Verwendung von Paracetamol simuliert werden (72, 73).

1.3 Der Wnt Signalweg

1.3.1 Aktivierung des Wnt Signalweges

Die durch Wnt Proteine induzierten Signalkaskaden innerhalb der Zelle sind in verschiedenen Spezies über den evolutionären Prozess hoch konserviert geblieben. Ursprünglich wurde der Wnt-Signalweg in der Fruchtfliege *Drosophila Melanogaster* als ein linearer, aus vier Komponenten bestehender Signalweg beschrieben (74). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass der Wnt-Signalweg auch in Vertebraten verschiedene Prozesse wie die Proliferation, Differenzierung, Motilität sowie Apoptose oder das Überleben von Zellen während der Embryonalentwicklung, aber auch die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase des entwickelten Organismus reguliert (75, 76). In den letzten Jahren wurden verschiedene an der Wnt Signaltransduktion beteiligte Komponenten beschrieben, die zeigen, dass sich der Signalweg in der Zelle in verschiedene Signalkaskaden spaltet, welche dann unterschiedliche zelluläre Funktionen regulieren. Neben dem ursprünglich beschriebenen kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurden der planare Zellpolaritätsweg, der Wnt/ Ca^{2+} -Weg (Abb. 4) und ein die Spindelorientierung und asymmetrische Zellteilung regulierender Weg beschrieben (77). Die Wnt-Proteine sind sekretorische, Cystein-reiche Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von 39-46 kDa. Es sind 21 Wnt-Proteine bekannt, von denen 19 im Menschen vorkommen. Durch die Bindung der Proteine der Wnt-Familie an ihre Rezeptoren wird der Wnt-Signalweg aktiviert (78). Die Rezeptoren der Wnt-Proteine sind die Frizzled (Fzd)-Rezeptoren, 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren, von denen bisher 13 verschiedene Rezeptoren bekannt sind und 11 im Menschen vorkommen. Für die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges ist die Bindung eines Wnt an die Fzd-Rezeptoren und an deren Corezeptor, das LDP-Rezeptor-ähnliche Protein (*lipoprotein receptor-related protein 5/6*, LRP 5/6), notwendig. Da in der Arbeit nur der kanonische Wnt-Signalweg untersucht wurde, wird im Folgenden nur auf diesen eingegangen.

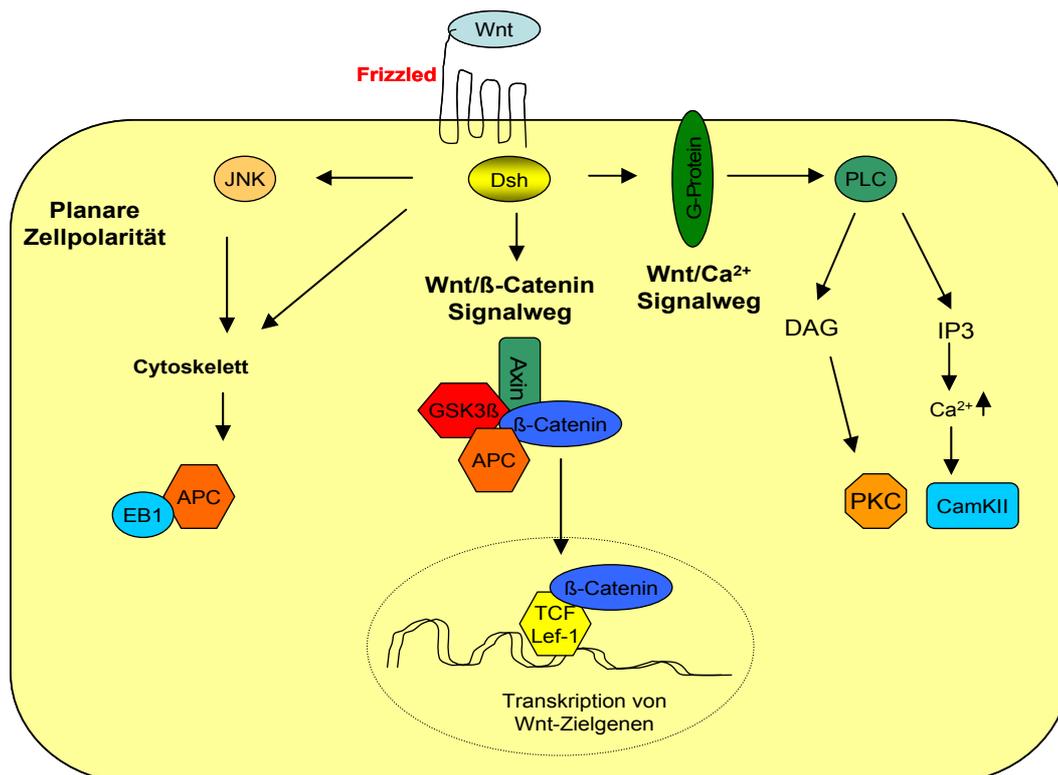


Abbildung 4: Schematischer Überblick der verschiedenen Signalkaskaden innerhalb der Zelle nach Aktivierung des Frizzled-Rezeptors durch Wnt-Proteine. (JNK, Jun-N-terminale-Kinase; EB1, Mikrotubuli bindendes Protein; APC, adenomatöse Polyposis Coli Protein; GSK3 β , Glykogensynthase-Kinase-3 β ; LEF-1, Lymphoid Enhancer Factor-1; TCF, T-Cell Factor; PLC, Phospholipase C; DAG, Diacylglycerol; IP3, Inositol-1,4,5-trisphosphat; PKC, Proteinkinase C; CamKII, Calmodulin-abhängige Kinase).

1.3.2 Der kanonische Wnt Signalweg

Im kanonischen Wnt-Signalweg stellt das β -Catenin die zentrale Komponente dar. Nach der Bindung des Wnt an den Rezeptor wird das Signal in das an der Zellmembran rekrutierte cytoplasmatische Phosphoprotein Dishevelled (Dsh) übertragen. Der Mechanismus dieser Signalübertragung ist noch nicht vollständig geklärt. Zwei mögliche Mechanismen werden jedoch postuliert. Die Assoziation zwischen Fzd und Dsh (79) oder alternativ die Wnt-abhängige Phosphorylierung von Dsh (80). Dabei könnten die Kinasen PAR-1 und CKII das Dsh-Phosphoprotein direkt phosphorylieren. Die genaue Rolle der beiden Kinasen und die des phosphorylierten Dsh bei der Signalübertragung sind noch nicht geklärt (81). Der andere Mechanismus der Signalübertragung könnte über Axin ablaufen, indem das Protein direkt an den Wnt-aktivierten, cytoplasmatischen Teil des LRP 5/6 bindet (82). Die

Aktivierung des Dsh führt dann zur Destabilisierung des cytoplasmatischen Multiproteinkomplexes, bestehend aus Axin, APC, Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK3 β), Casein-Kinase 1 α (CK1 α) und β -Catenin (83). Solange dieser Komplex intakt ist, wird das β -Catenin an Ser³³, Ser³⁷, Tyr⁴¹ durch die GSK3 β und an Ser⁴⁵ durch die CK1 α phosphoryliert und von einer Untereinheit des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes, dem *β -transducing repeat containing protein* (β -TrCP) erkannt. Nach der Ubiquitinylierung des β -Catenins durch β -TrCP wird dieses über das Proteasom abgebaut und steht der Zelle nicht mehr zur Verfügung. Durch die Destabilisierung des [Axin, APC, GSK3 β und CK1 α]-Multiproteinkomplexes, kann das cytosolische β -Catenin nicht mehr phosphoryliert werden. Es kommt zu einer Anreicherung des nicht phosphorylierten β -Catenins im Zellkern. Die Translokation des β -Catenins in den Zellkern führt zur Aktivierung der Transkription von Wnt-Zielgenen (78, 84), indem es den Repressor Groucho verdrängt (Abb. 5) und zusammen mit Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF Familie an das TCF/Lef Bindemotiv (A/T A/T CAA A/T GG) der DNA bindet (85, 86). Die TCF/Lef Proteine sind eine hoch konservierte Familie von Transkriptionsfaktoren (Abb. 6). Ein gemeinsames Merkmal ist eine 80 Aminosäuren umfassende [*high mobility group* (HMG)]-Box, die im C-terminalen Bereich der Proteine lokalisiert ist und an das Bindemotiv in der kleinen Furche der DNA bindet (87). Ein weiteres gemeinsames Merkmal sind die 56 N-terminalen Aminosäuren für die Bindung des β -Catenins. Das Lef-1 unterscheidet sich von den meisten anderen TCF-Proteinen durch eine C-terminale Domäne. Diese Domäne führt bei TCF-3 und TCF-4 zu einer verstärkten Repression der Wnt-Zielgene nach Interaktion mit dem C-terminalen Bindeprotein (CtBP) (88). Außerdem besitzt Lef-1 eine Kontext-abhängige Aktivierungsdomäne, was anhand von Untersuchungen des *T-cell receptor alpha* (TCR α) gezeigt werden konnte (89). Über diese Domäne interagiert Lef-1 mit dem Cofaktor ALY, der durch seine Bindung an den Transkriptionsfaktor *acute myeloid leukemia factor-1* (AML-1) die Transkriptionsaktivierung am TCR α Enhancer vermittelt. Neben den Proteinen der TCF/LEF-Familie können auch andere Transkriptionsfaktoren, wie die Histon Acetylase CBP/p300 und der SW1/SNF Komplex, die das Chromatin um die TCF Bindestelle reorganisieren, binden (90).

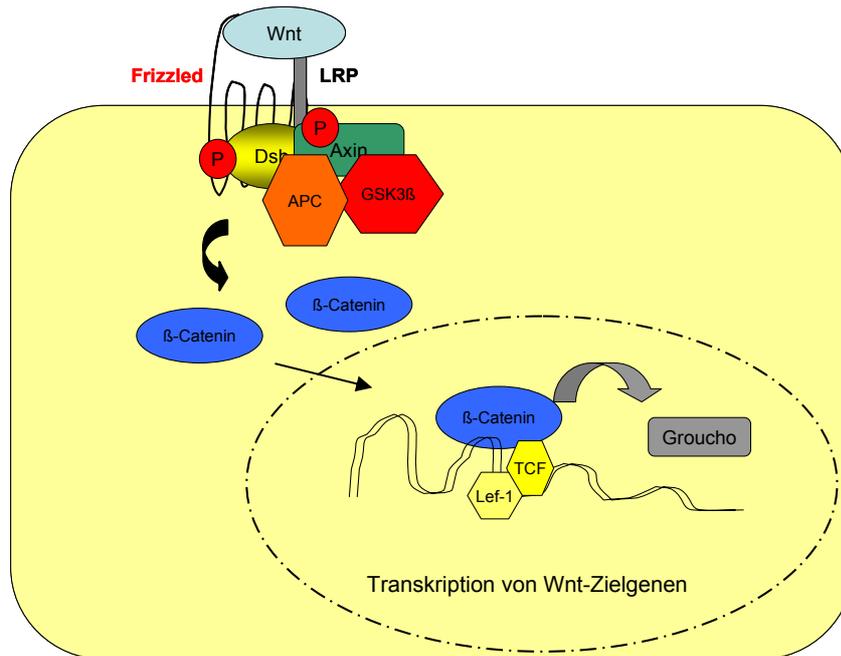


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Aktivierung der Transkription von Wnt-Zielgenen über den Wnt-Signalweg. Nach der Bindung von Wnt-Proteinen an den Fzd-Rezeptor kommt es zur Destabilisierung des Multiproteinkomplexes, bestehend aus APC, Axin, GSK3β und β-Catenin. Dies führt zu einer Kerntranslokation des nicht phosphorylierten β-Catenins. Nach Bindung an Transkriptionsfaktoren der TCF/Lef-Familie und Verdrängung des Repressors Groucho kommt es zur Transkription von Wnt-Zielgenen (LRP, LDP-Rezeptor-ähnliches Protein; Dsh, Dishevelled; APC, adenomatöse Polyposis Coli Protein; GSK3β, Glykogensynthase-Kinase-3β; LEF-1, Lymphoid Enhancer Factor-1; TCF, T-Cell Factor).

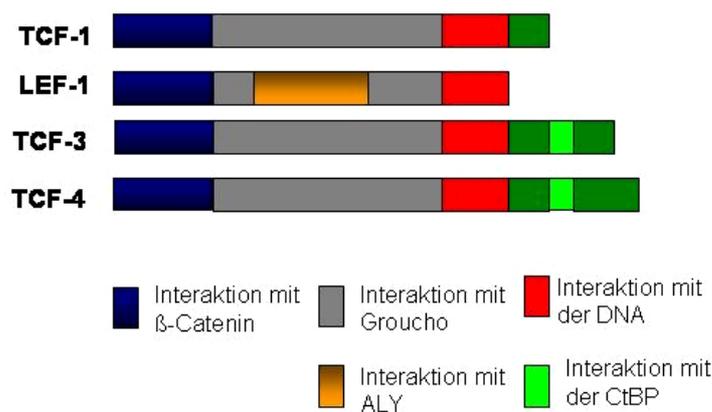


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Struktur der TCF/Lef-Proteine. Die β-Catenin-bindende Domäne und die DNA-bindende HMG-Box sind innerhalb der Familie hochkonserviert. Die einzelnen TCF-Familienmitglieder unterscheiden sich vor allem in der Länge ihrer auf die HMG-Box (roter Bereich) folgenden, C-terminalen Domäne (dunkelgrün). Lef-1 fehlt diese C-terminale Domäne.

1.3.3 Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Differenzierung von Stammzellen

In Vertebraten wird durch Wnt-Liganden der ‚kanonische‘ Wnt/ β -Catenin Signalweg bzw. einer oder mehrere β -Catenin unabhängige ‚nicht-kanonische‘ Signalwege aktiviert (91). Die Rolle des Wnt- β -Catenin-abhängigen Signalweges während der Differenzierung von Stammzellen ist noch unklar. Neueste Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die Selbsterneuerung von HSC über den ‚kanonischen‘ Wnt/ β -Catenin Signalweg beeinflusst wird (92, 93). Durch Untersuchungen im Knochenmark, in welchem HSC und MSC in ihrer Stammzellnische nebeneinander vorkommen, konnte eine Kollokalisierung des nicht-kanonischen Wnt-5a Proteins mit CD 45⁺-HSC und CD45⁻-MSC nachgewiesen werden (94). Die Expression des kanonischen Wnt-3a Proteins war mit der umgebenden Stromamatrix assoziiert, was eine regulatorische Rolle der Wnt-Proteine im Knochenmark nahe legt. Nach Isolierung von Knochenmarkszellen ohne weitere Aufreinigung konnte gezeigt werden, dass die Zellzahl und die Plastizität der Stammzellen nur nach Behandlung mit Wnt-3a, nicht aber mit Wnt-5a zunahm. Unter osteogenen Differenzierungsbedingungen hingegen nahm die Zellzahl nach Behandlung mit Wnt-5a nicht aber mit Wnt-3a zu, was eine duale Rolle der Wnt-Proteine und des damit verbundenen Wnt/ β -Catenin Signalweges im Zuge der Differenzierung nahe legt (94). In undifferenzierten MSC bewirkt Wnt-3a durch Bindung an den Fzd-Rezeptor zusammen mit dem Korezeptor LRP5 über den kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg und TCF1 alpha eine Erhöhung der Proliferationsrate. Eine Überexpression des Korezeptors LRP5 führt, verstärkt durch Wnt-3a, zur Inhibition der osteogenen Differenzierung. Im Gegensatz dazu zeigt die Behandlung mit Wnt-5a keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Sie verstärkt jedoch die osteogene Differenzierung. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass während der osteogenen Differenzierung Wnt-5a offensichtlich die Wnt-3a-vermittelten Effekte inhibiert, während Wnt-3a die Wnt-5a-vermittelte osteogene Differenzierung unterdrückt (95). Diese unterschiedlichen Einflüsse von kanonischen und nicht-kanonischen Wnt-Proteinen auf die Differenzierung der MSC deuten auf eine zentrale Rolle der Wnt-Rezeptoren und ihrer Korezeptoren hin. Durch die Aktivierung der Wnt-Rezeptoren und der damit verbundenen Stabilisierung des β -Catenins mit nachfolgender Kerntranslokation kommt es zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen des Wnt-Signalweges. Dazu gehören unter anderem an

der Zellproliferation beteiligte Proteine wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), c-myc, Cycline und Proteine des Wnt-Signalweges (96-98). Die Beteiligung des Wnt-Signalweges an der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen wurde bisher nicht untersucht.

1.3.4 Der Wnt-Signalweg in der Leber

Ursprünglich wurde β -Catenin als ein Protein identifiziert, das an die cytoplasmatische Domäne des Ca^{2+} -abhängigen Zell-Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin bindet (99). Dabei vermittelt β -Catenin zusammen mit α -Catenin die Assoziation von E-Cadherin-Molekülen mit den F-Actinfilamenten des Cytoskeletts. Das membranlokalisierte β -Catenin kann jedoch in Hepatozyten von der Membran dissoziieren und wie das cytoplasmatische β -Catenin in den Zellkern gelangen. In der Leber ist β -Catenin auch an den HGF-Rezeptor (*hepatocyte growth factor receptor* (HGFR; c-met)) assoziiert. Nach Bindung des HGF werden die Tyrosine 654 und 670 des β -Catenins durch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität der Kinase c-met phosphoryliert was zu einer Translokation in den Zellkern führt (100). Dies führt zur Verringerung der Adhäsion benachbarter Hepatozyten und fördert somit die Mitogenese und aufgrund der nukleären β -Catenin-Wirkung die Morphogenese über die Induktion hepatozytenspezifischer Gene (101, 102). In der menschlichen Leber sind bisher 11 verschiedene Wnt-Proteine und 10 verschiedene Fzd-Rezeptoren nachgewiesen worden (101). Eine bedeutende Rolle als „Gatekeeper“ der Zonierung (103) in der Leber hat der Wnt/ β -Catenin-Signalweg durch das APC, das zur Destabilisierung des β -Catenins essentiell ist. APC wird in den periportalen Regionen der Leberläppchen stark exprimiert (103) und führt somit zu einer verringerten β -Catenin Aktivierung. In perivenösen Bereichen der Leberläppchen ist keine APC-Expression nachweisbar und somit die nachfolgende β -Catenin-abhängige Genexpression stark erhöht. Zu den Zielgenen des Wnt- β -Catenin-Signalweges gehören u. a. die Glutaminsynthetase, die Ornithinaminotransferase und der Glutamattransporter GLT-1 (104-106). Entsprechend ist auch deren Expression in perivenösen Leberbereichen erhöht, wodurch hier die Ammoniakentgiftung gewährleistet wird. In periportalen Bereichen der Leberläppchen hingegen ist APC hoch exprimiert, was mit der Inhibition der Expression perivenöser Gene einhergeht und somit die Expression periportalere Gene begünstigt. Eine zentrale Rolle könnte dabei die Glykogensynthetase-Kinase-3 (GSK3) spielen, die als ein zentrales Enzym

des Glykogen-Stoffwechsels 1980 zuerst identifiziert wurde (107) und als Komponente des Wnt/ β -Catenin Signalweges eine zentrale Rolle einnimmt (78, 108). Die Aktivität der GSK3 kann jedoch durch Serinphosphorylierung inhibiert werden (Ser²¹, in der GSK3- α , und Ser⁹ in der GSK3- β), welches durch die Proteinkinase B (PKB) (109) oder durch den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) über die klassische MAPKinase-Kaskade oder über den PKB-Signalweg (110) katalysiert wird. Axin und APC sind dabei Substrate der GSK3. Die Phosphorylierung von Axin durch die GSK3 stabilisiert das Protein (111), wohingegen die Phosphorylierung des APC offensichtlich die Interaktion mit β -Catenin begünstigt (112). Dieser Prozess wiederum treibt die GSK3-abhängige Phosphorylierung und damit die Degradation des cytosolischen β -Catenins voran. Für die Phosphorylierung dieser Proteine muss die GSK3 ein Phosphat von dem Ser⁹ auf ihr Substrat übertragen. Die GSK3 wird jedoch nicht am Ser⁹ infolge der Wnt-Antwort phosphoryliert, sodass diese Phosphorylierung über einen anderen Mechanismus erfolgen muss (109, 113). Inwieweit diese molekularen Mechanismen an der hepatogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen beteiligt sind, ist weitestgehend ungeklärt.

1.4 Ziel der Arbeit

Im Rahmen der Arbeit sollte untersucht werden, ob MSC zur Regeneration der Leber nach partieller Hepatektomie beitragen können. Dazu sollte zunächst die Methode zur Isolierung der mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, dem peritonealen und dem subkutanem Fettgewebe etabliert werden. Zusätzlich sollten die Zellen hinsichtlich Plastizität und Oberflächenexpressionsprofil charakterisiert und ihre Fähigkeit zur hepatogenen Differenzierung in Anlehnung an in der Arbeitsgruppe etablierte Protokolle *in vitro* und *in vivo* im syngenen Rattenmodell und im xenogenen Mausmodell untersucht werden. Weiterhin sollten die molekulargenetischen Mechanismen des Wnt/ β -Catenin Signalweges während der hepatogenen Differenzierung *in vitro* untersucht werden. Das Fernziel der vorliegenden Arbeit lag darin, die Effizienz der Leberregeneration durch Transplantation mit hepatogen differenzierten MSC zu verbessern.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Materialien

Standardlabormaterialien wie Pipetten, Reaktionsgefäße, und ähnliches werden nicht aufgeführt. Nur die Labormaterialien, die von den Standardlabormaterialien abweichen, werden im Folgenden aufgeführt.

SuperFrost® Objektträger – Menzel GmbH + Co KG (Braunschweig, Deutschland)

Immobilin-P Transfer Membrane – Millipore Corporation (Billerica, USA)

Anatomische Pinzetten und Scheren mittel, klein, gerade und gebogen – Conatex Didactic GmbH (Neunkirchen, Deutschland)

Nahtmaterial, resorbierbar – Catgut GmbH (Markneukirchen, Deutschland)

Venenverweilkanüle Optiva 2 - Johnson&Johnson (Düsseldorf, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Größenstandards

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Roth, Sigma, Fluka, Serva und Merck erworben.

Restriktionsenzyme, 2 x PCR Master Mix und DNA-Größenstandards – Fermentas

Protein-Größenstandards – BioRad

DMEM-HG (4,5 g/l Glucose), DMEM-LG (1 g/l Glucose) mit und ohne Pyruvat, FKS und Trypan Blue – Gibco

Pulvermedien D-MEM ohne NaHCO₃ und Glucose, MCDB-201, und PBS – Biochrom

Pulvermedium MEM – Sigma

Penicillin-Streptomycin und Trypsin – ccPro

Sämtliche Chemikalien und Reagenzien entsprachen dem Reinheitsgrad p.A. bzw. Zellkultur-getestet.

2.1.3 Geräte

Geräte, die nicht zur Standard Laborausrüstung gehören, werden nicht aufgeführt. Im Folgenden werden nur Geräte aufgeführt die nicht zur Standardlaborausrüstung gehören.

Odyssey Infrared Imaging System – LI-COR GmbH (Bad Homburg, Deutschland)

MEV Slee Cryostat – Slee Medical GmbH (Mainz, Deutschland)

HM 325 Microm – GMI Inc. (Ramsey, USA)

Nicon Eclipse E600 Fluoreszenz -Mikroskop – Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Nicon Eclipse E4200 Fluoreszenz-Mikroskop – Nikon GmbH (Düsseldorf, Deutschland)

Konfokales Laserscanmiroskop Leica TCS SP5 – Leica Camera AG (Solms, Deutschland)

Glomax 96 Microplate Luminometer – Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)

FACS Calibur – BD Bioscience GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Optima™ L-90K Ultrazentrifuge – Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)

Syngene Bioimaging System – Synoptics LTD (Cambridge, UK)

2.1.4 Bakterienstämme

| Bezeichnung | Genotyp |
|-------------|---|
| DH5 alpha | F' Phi80dlacZ DeltaM15 Delta (lacZYA argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-mK+) phoA supE44 lambda-thi-1 |
| TOP10 | F- mcrA D (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139 D (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG |

2.1.5 Zelllinien

HEK 293 T Human Embryonal Kidney

J Gen Virol 1977;36:59

Huh-7 Human Hepatocellular Carcinoma

Nature 1979;282:615-616

2.1.6 Versuchstiere

CD26^{-/-} Fischer 344 Ratten – Eigenzucht

Wildtyp (wt) Fischer 344 Ratten – CharlesRiver (Sulzfeld, Deutschland)

Pfp/Rag2 Mäuse (B6.129S6-*Pfp*^{1tm1Clrk} *Rag2*^{tm1Fwa}N12) – Taconic (Köln, Deutschland)

2.1.7 Antikörper

Alle verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 2 und alle verwendeten Sekundärantikörper in Tabelle 3 zusammengefasst.

| Antikörper | Typisierung | Anbieter | Verdünnung/Anwendung /Konjugat |
|---|----------------|-----------------|-----------------------------------|
| anti-human CD13 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, PE |
| anti-human CD14 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, FITC |
| anti-human CD29 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, PE |
| anti-human CD34 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, FITC |
| anti-human CD44 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, PE |
| anti-human CD45 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, FITC |
| anti-human CD105 | mAK, Maus | Serotec | 1:100 FACS, FITC |
| anti-human CD166 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1.100 FACS, PE |
| anti-Ratte CD44 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, FITC |
| anti-Ratte CD45 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:100 FACS, PE |
| anti-Ratte CD29 | mAK, Hamster | BD Bioscience | 1:100 FACS, FITC |
| anti-human CD29 | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:600, WB 1:100 IC |
| anti-human Phospho-GSK3 β | pAK, Kaninchen | Cell Signalling | 1:1000, WB 1:50 ICC |
| anti-human GSK3 β | pAK, Kaninchen | Cell Signalling | 1:1000, WB 1:50 ICC |
| anti-human Phospho- β -Catenin | pAK, Kaninchen | Cell Signalling | 1:1000, WB 1:50 ICC |
| anti-human β - Catenin | mAK, Maus | Santa Cruz | 1:1200, WB 1:100 ICC |
| anti-human TCF-4 | pAK, Kaninchen | Santa Cruz | 1:750, WB |
| anti-human LEF-1 | mAK, Maus | Santa Cruz | 1:200, WB |
| anti-human APC | mAK, Maus | Santa Cruz | 1:500, WB |
| anti-human Glutaminsynthetase | mAK, Maus | BD Bioscience | 1:5000, WB |
| anti-Vinculin | mAK, Maus | Sigma | 1:1000, WB |
| anti-GFP | pAK, Kaninchen | Chemicon | 1:800, WB, 1:500 IC |
| anti-SMA | pAK, Kaninchen | abcam | 1:200, ICC |
| anti-human | mAK, Maus | Dako Cytomation | 1:50, IC, ICC |

| | | | |
|--------------------|----------------|--|------------------------|
| Hepatocyte | | | |
| anti-human Albumin | pAK, Kaninchen | abcam | 1:1000 IC |
| anti-human CX_32 | mAK Maus | Santa Cruz | 1:100 ICC |
| anti-IMP-1 | mAK, Maus | von der AG Hüttelmaier zur Verfügung gestellt | 1:1000, WB 1:100 IC |

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper; Abkürzungen: WB-Western Blot, ICC-Immuncytochemie, IC-Immunhistochemie

| Antikörper | Typisierung | Anbieter | Verdünnung/Anwendung/Konjugat |
|----------------|-------------|--------------------|------------------------------------|
| anti-Maus | pAK, Ziege | Dianova | 1:1000, WB HRP 1:700, IHC, HRP |
| anti-Kaninchen | pAK, Ziege | Dianova | 1:1000, WB, HRP 1:700, IHC, HRP |
| anti-Maus | pAK, Ziege | Dianova | 1:300, ICC, FITC |
| anti-Maus | pAK, Ziege | Dianova | 1:400, ICC, Cy-3 |
| anti-Kaninchen | pAK Ziege | Dianova | 1:400, ICC, Cy-3 |
| anti-Maus | pAK, Ziege | Invitrogen | 1:100, ICC, Alexafluor488 |
| anti-Kaninchen | pAK, Ziege | Invitrogen | 1:100, ICC, Alexafluor488 |
| anti-Maus | pAK, Ziege | Li-Cor Biosciences | 1:10.000, WB, IRDye 800CW |
| anti-Maus | pAK, Ziege | Li-Cor Biosciences | 1:10.000, WB, IRDye 680 |
| anti-Kaninchen | pAK, Ziege | Li-Cor Biosciences | 1:10.000, WB, IRDye 800CW |
| anti-Kaninchen | pAK, Ziege | Li-Cor Biosciences | 1:10.000, WB, IRDye 680 |

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper; Abkürzungen s.

Tabelle 2.

2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidsynthesen wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die in der Tab. 4 aufgeführten Oligonukleotide dienen alle zur Erstellung von Genexpressionsmustern in der RT-PCR.

| Oligonukleotid | Sequenz 5'→3' | T _A °C | Zyklen |
|----------------|---|-------------------|--------|
| h-GAPDH | S: GACCCCTTCATTGACCTC AS: GCAATGCCAGCCCCAG | 56 | 24 |

| | | | |
|-----------------|---|----|----|
| h-LPL | S: ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC AS: AS: AS: TACAGGGCGGCCACAAGTTTT | 64 | 26 |
| h-PPAR γ | S: GCTGTTATGGGTGAAACTCTG AS: ATAAGGTGGAGATGCAGGCTC | 64 | 26 |
| h-OC | S: ATGAGAGCCCTCACACTCCTC AS: CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG | 63 | 26 |
| h-ON | S: GGGCTCTGCCTTAAACACAC AS: GCTCCCAAAGTTTGAACCA | 63 | 26 |
| h-AFP | S: AAGTCGATGAAACATACGTT AS: CGAGCAGCCCAAAGAAGAATTG | 59 | 27 |
| h-CK7 | S: GCGGAGCATGCAGGATGT CTCGCCCTCCAGCAGCT | 62 | 32 |
| h-CK18 | S: GAAGGAGACCATGCAAAGCCTG AS: CATGAAGAGCAGCTCCTCCTTG | 62 | 18 |
| h-CK19 | S: CGAACCAAGTTTGAGACGGAAC AS: CCGCTGGTACTCCTGATTCTGC | 62 | 30 |
| h-CX43 | S: TGGCCTTCTTGCTGATCCAG AS: TTGCGGCAAGAAGAATTGTTTC | 58 | 32 |
| h-CX32 | S: GGCGTGAACCGGCATTCTAC AS: ACAACAGCCGGAACACCACG | 61 | 35 |
| h-CYP3A4 | S: TCTCATCCCAGACTTGCCAT AS: GAAGACAGAATAACATTCTT | 55 | 35 |
| h-PCK | S: GGCCGCACCATGTATG AS: AAGATCAGCATGTGCTC | 53 | 30 |
| h-CPS | S: CTGTAAAAGCCATGAAGG AS: CAATGGTGTCTGCTGCC | 63 | 32 |
| h-CD26 | S: ATAGTAGCTAGCTTTGATGGCA AS: CAGCTCTGCTCATGACTGTTG | 62 | 26 |
| h-Alb | S: GATGTCTTCCTGGGCA AS: CTTGGGCTTGTGTTTCAC | 59 | 28 |
| h-TFN | S: GTGGCCTTTGTCAAGCA AS: CTCCATCCAAGCTCATG | 52 | 32 |
| h-Fzd-1 | S: AGGCCATCGAAGCCAACTCA AS: TTGCCGGACCAGATCCAGAA | 60 | 28 |
| h-HGFR | S: CAAAAAGTTTGTCCACAGAGAC AS: CGTTCACATGGACATAGTGCT | 57 | 28 |
| r-GAPDH | S: GACCCCTTCATTGACCTC | 56 | 24 |

| | | | |
|----------|---|----|----|
| | AS: GCAATGCCAGCCCCAG | | |
| r-LPL | S: ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC AS: CTGGATAATGTTGCTGGGCCC | 62 | 26 |
| r-ON | S: ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTC AS: CAAAGAAGTGGCAGGAAGAGTCGA | 64 | 26 |
| r-CK7 | S: GCGGAGCATGCAGGATGT AS: CTCGCCCTCCAGCAGCT | 62 | 34 |
| r-CK18 | S: TGAGGGCTCAGATCTTTGCG AS: CTTGTCCAGTTCCTCACGGTTC | 61 | 24 |
| r-CK19 | S: ACTTGCGCGACAACATCCTTG AS: ACAGCGACCTGGGTGTTCAAC | 61 | 34 |
| r-Nestin | S: TCGCTTAGAGGTGCAACAGC AS: CTCTGTAGACCTTGCTTCTCC | 60 | 30 |
| r-CD26 | S: ATAGTAGCTAGCTTTGATGGCA AS: CAGCTCTGCTCATGACTGTTG | 53 | 28 |
| r-Alb | S: AAACGCCGTTCTGGTTCGATAC AS: GGGCTTGTGTTTCACCAGCTC | 61 | 22 |
| r-CX32 | S: TGGCGTGAATCGGCATTCTAC AS: CTCAAACAGCAGCCGGAACAC | 61 | 24 |
| r-CX43 | S: CCTCCTGTACTTGGCCCATGTG AS: AGCGAGAGACACCAAGGACACC | 64 | 28 |
| r-CYP1A1 | S: CCAATGTCATCTGTGCCAT AS: TGTGTCAAACCCAGCTCC | 55 | 32 |
| r-FoxM1 | S: TCCAGAGCATCATCACAGCG AS: TGCTCCAGGTGACAATTCTCC | 66 | 30 |
| r-AFP | S: CCTGACAGGGAAGATGGTGAGC AS: GCACTTCTCCAAGAGGCCAGAG | 64 | 30 |
| r-PCK | S: GGCCGCACCATGTATG AS: AGGATCAGCATGTGCTC | 53 | 30 |

Tabelle 4: Zusammenstellung der in der RT-PCR verwendeten Oligonukleotide.

Abkürzungen: h-human, r-Ratte, S-sense, AS-antisense

2.1.9 Plasmide

pRL-SV40 Vector zum internen Abgleich der Transfektionseffizienz im *Dual Luciferase* System – Promega (Mannheim, Deutschland)

pGL-hPCK -457/+65 für die Klonierung des humanen PCK-Promotors in den lentiviralen FUGW Vector – in der Arbeitsgruppe vorhanden.

pGL-rPCK -493/+33 für die Klonierung des PCK-Promotors der Ratte in den lentiviralen FUGW Vector – in der Arbeitsgruppe vorhanden.

Super8XTOPFlash und Super8XFOPFlash in pTA-Luc Vector von Clontech für die Klonierung des 8xTCF/Lef1 Bindemotivs bzw. des mutierten Bindemotivs mit *Firefly Luciferase* Reporter in den lentiviralen FUGW Vector – freundlicherweise von Herrn Dr. Randall Moon (HHMI/Pharmacology, University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt.

Das lentivirale Gentransfersystem mit den Plasmiden FUGW, VSVG, Rsv-Rev und pMDL g/p RRE mit dem FUGW Konstrukt EGFP unter Kontrolle des Ubiquitin Promotors wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. T. Braun (Kerckhoff Institut für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Kits

Invisorb Spin Plasmid Mini Two – Invitex (Berlin, Deutschland)

Invisorb Spin DNA Extraction Kit – Invitex (Berlin, Deutschland)

MSB Spin PCRapace Kit – Invitex (Berlin, Deutschland)

Qiagen Plasmid Midi Kit – Qiagen (Hilden, Deutschland)

SV Total RNA Isolation System – Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)

RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit – Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2 X PCR Master Mix – Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

ECL™ Western Blotting Detection Reagents – Amersham Biosciences (Little Chalfont, UK)

Dual-Luciferase ® Reporter Assay System – Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)

Luciferase Assay System – Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)

Effectene Transfection Reagent – Qiagen (Hilden, Deutschland)

Peroxidase Substrate Kit DAB – Linaris Biologische Produkte (Wertheim, Deutschland)

Human Albumin ELISA Quantitation Kit – Bethyl Laboratories (Montgomery – USA)

2.1.11 Medien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium (Bertani, 1951). Zur Selektion auf Ampicillinresistenz wurde sowohl in der Flüssigkultur als auch in Agarplatten 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Die Kultivierung der adhären Zellen HEK-293 T und Huh-7 erfolgte in DMEM-HG mit Pyruvat und essentiellen Aminosäuren unter Zugabe von 10 % FKS und 1 % Pen/Strep.

2.1.11.1 EM6F

Medium zur Kultivierung von Stammzellen (pH: 7,2). Mischung aus 60 % DMEM-LG mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃ und 40 % MCDB 201 mit L-Glutamin, 30mM HEPES und 42mM NaHCO₃ (zugesetzt). Zu diesem Gemisch wurden bis zur Endkonzentration 5 ng/ml Selen, 5 µg/ml Transferrin, 4,7 µg/ml Linolsäure, 1 nM Dexamethason, 5 µg/ml Insulin, 0,1 mM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 1 % Pen/Strep und 15 % FKS zugesetzt und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.2. HHMM

Medium zur hepatogenen Differenzierung und zur Kultivierung von humanen Hepatozyten (pH: 7,2). Mischung aus 50 % DMEM-HG mit L-Glutamin ohne Natriumpyruvat, 25 % DMEM ohne Glucose mit L-Glutamin ohne Natriumpyruvat und 25 % MEM mit 4 mM NaHCO₃ (zugegeben). Zu diesem Gemisch wurden bis zur Endkonzentration 0,1 % Albumin, 5,55 mM Galaktose, 0,3 mM Ornithin, 0,13 mM Prolin, 4,99 mM HEPES, 1,25 mM Nicotinamid, 0,5 mM L-Glutamin, 2 mM ZnCl₂, 0,8 mM CuSO₄, 2,6 mM ZnSO₄, 14,8 mM MnSO₄, 50 µg/ml Insulin, 50 mg/ml Gentamycin, 50 nM Dexamethason, 0,0025 % ITS, 2 % FKS, 1 % Pen/Strep zugesetzt und anschließend sterilfiltriert. Kurz vor Gebrauch wurde dem Medium noch bis zur Endkonzentration 20 µg/l EGF (PeproTech; Hamburg, Deutschland) und 40 µg/l HGF (Strathmann Biotec AG; Hamburg, Deutschland) zugesetzt.

2.1.11.3 HGM

Medium zur hepatogenen Differenzierung und zur Kultivierung von murinen Hepatozyten (pH: 7,2). Mischung aus 50 % DMEM ohne Glucose mit L-Glutamin ohne Natriumpyruvat und 50 % DMEM-HG mit L-Glutamin ohne Natriumpyruvat. Zu

dieser Mischung wurden bis zur Endkonzentration 0,2 % Albumin, 11,1 mM Galaktose, 0,6 mM Ornithin, 0,26 mM Prolin, 9,98 mM Hepes, 2,5 mM Nicotinamid, 0,99 mM Glutamin, 2 mM ZnCl₂, 0,8 mM CuSO₄, 2,6 mM ZnSO₄, 14,8 mM MnSO₄, 1 mM Dexamethason, 0,1 % ITS, 1% Pen/Strep, 2 % FKS zugesetzt und anschließend sterilfiltriert. Kurz vor Gebrauch wurde dem Medium noch bis zur Endkonzentration 20 µg/l EGF und 40 µg/l HGF zugesetzt.

2.1.11.4 Osteogenes Differenzierungsmedium (ODM)

Medium zur osteogenen Differenzierung von murinen und humanen MSC (pH: 7,2). Zu DMEM-LG wurden bis zur Endkonzentration 0,2 mM L-Ascorbinsäure, 1 mM Dexamethason, 10 mM Glycerol-3-Phosphat, 10 % FKS, 1 % Pen/Strep zugesetzt und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.5 Adipogenes Differenzierungsmedium (ADM)

Medium zur adipogenen Differenzierung von murinen und humanen MSC (pH: 7,2). Zu DMEM-LG wurden bis zur Endkonzentration 50 µM Dexamethason, 10 µg/ml Rinder-Insulin, 100 µM Indomethin, 500 µM 3-iso-butyl-1-Methylxanthine, 5 µM Rosiglitazon, 10 % FKS, 1 % Pen/Strep zugesetzt und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.6 Krebs-Ringer Puffer (1 x KRP)

Puffer zur Verwendung bei der Isolierung von Hepatozyten. Zu Aq. dest. wurden bis zur Endkonzentration 120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄ und 24,4 mM NaHCO₃ zugesetzt.

2.1.11.7 Präperfusionspuffer

Puffer zur Isolierung von Hepatozyten (pH: 7,35). Zu 1 x KRP wurden bis zur Endkonzentration 0,25 mM EGTA zugesetzt, der Puffer 30 min mit Carbogen begast und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.8 Collagenase-Perfusionspuffer

Puffer zur Isolierung von Hepatozyten (pH: 7,5). Zu 1 x KRP wurden bis zur Endkonzentration 15 mM Hepes, 4 mM CaCl₂, 0,7 mg/ml Collagenase NB-4 (Serva) zugesetzt, der Puffer 30 min mit Carbogen begast und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.9 Waschpuffer

Puffer zur Aufreinigung von frisch isolierten Hepatozyten (pH: 7,4). Zu Aq. dest. wurden bis zur Endkonzentration 20 mM Hepes, 120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,2 mM KH₂PO₄, 0,4 %BSA, 50 mg/l DNaseI zugesetzt, der Puffer 30 min mit Carbogen begast und anschließend sterilfiltriert.

2.1.11.10 Einsaatmedium für Hepatozyten

Zu MEM wurden bis zur Endkonzentration 4 mM NaHCO₃, 500 ng/l Rinder-Insulin, 50 µg/ml Gentamycin zugesetzt und anschließend sterilfiltriert (pH: 7,2)

2.2 Methoden

Standardmethoden wie DNA-Gelelektrophorese, Fällung von DNA und dergleichen sind nach etablierten Protokollen (z.B. Sambrook 2003, Current Protocols 2005) durchgeführt worden. Bei Verwendung käuflicher *kits* wurde nach Herstellerangaben verfahren. Im Folgenden werden nur Methoden beschrieben, die von diesen Protokollen abweichen oder im Labor etabliert worden sind.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Isolierung von Hepatozyten aus der Ratte

Die Ratte wurde i.p. mit 90 mg/kg KG Pentobarbital (Merial, Hallbergmoos, Deutschland) narkotisiert, auf dem OP-Tisch an den Extremitäten fixiert und 0,2 ml Heparin i.p. injiziert. Nach Desinfektion des Bauchfells mit 70% Ethanol wurde der Bauchraum eröffnet, indem ein Schnitt in die Bauchdecke entlang der *Linea alba* bis zum Sternum geführt wurde. Der Magen und die Darmschlingen wurden nach rechts exponiert und die nun freiliegende Portalvene (*Vena portae*) zweimal lose ligiert. Die erste Ligatur erfolgte distal zur Milzvene, die zweite etwa 1 cm distal zur ersten. Zwischen beiden Ligaturen wurde eine, mit einem Vorratsgefäß über einen Silikonschlauch verbundene Verweilkanüle vorsichtig in die Portalvene eingeführt. Durch Zuziehen der beiden Ligaturen wurde die Kanüle fest eingebunden und der Blutnachstrom in der Portalvene verhindert. Schlauch und Kanüle wurden zuvor luftblasenfrei mit Präperfusionspuffer gefüllt und der Schlauch an die Kanüle angeschlossen, um die Leber bei einer Durchflussrate des Puffers von 20-25 ml/min

zu durchspülen. Sofort nach Anschluss wurde die untere Hohlvene punktiert, so dass Blut und Puffer aus dem Gefäßsystem abfließen konnten. Nachfolgend wurde der Brustraum mit einem Scherenschlag eröffnet, um das Tier durch Ligation der Hohlvene zwischen Zwerchfell und Herz abzutöten. Nach kompletter Entblutung der Leberlappen erfolgte die Zuleitung des collagenasehaltigen Perfusionspuffers. Dazu wurde der Pufferfluss kurzzeitig unterbrochen und das Pufferreservoir gegen ein Reservoir mit CPP getauscht. Die Durchflussrate betrug weiterhin 25 ml/min. Nach etwa 10 min war die Auflösung des Gewebeverbandes in der Leber deutlich sichtbar anhand der Schwellung und Auftreten dunkler Felderung. Nach Abstoppen des Perfusionsflusses wurde die Kanüle entfernt und die Leber aus der Bauchhöhle herauspräpariert. Das Organ wurde kurz in Waschpuffer gewaschen und danach die Leberkapsel in etwa 50 ml Waschpuffer mit einer sterilen Kanüle aufgeritzt. Durch leichtes Schwenken wurden die Hepatozyten und ein Großteil der Nichtparenchymzellen freigesetzt. Die Zellen wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal mit 50 ml Waschpuffer gewaschen (50 x g, 4°C). Hierbei wurden mit den Überständen ein Großteil der Nichtparenchymzellen und nicht-vitale Zellen abgetrennt. Nach dem letzten Waschschrift wurde mittels Trypanblau-Färbung die Vitalität ermittelt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit einer Dichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen/ml auf mit Collagen TypI beschichtete Zellkulturschalen in Einsaatmedium ausplattiert (Beschichtung nach Herstellerangaben, IBFB GmbH, Leipzig, Deutschland) und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 3 h wurden flottierende Zellen mit PBS abgewaschen und die Hepatozyten weiter in HGM kultiviert.

2.2.2 Isolierung von Hepatozyten aus der Maus

Die Tiere wurden mittels Forene (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) anästhesiert und nach Desinfektion der Operationsstelle der Bauchraum entlang der Linea alba eröffnet. Die weitere Vorgehensweise ist dieselbe wie bei unter 2.2.1 für Ratten beschrieben. Lediglich die Flussrate betrug 10 ml/min.

2.2.3 Transplantation von Stammzellen in die Ratte

Die Empfängertiere wurden sechs und vier Wochen vor der Transplantation mit 30 mg/kg KG Retrorsin i.p. vorbehandelt. Für die Transplantation wurden die Tiere mit Foren anästhesiert, das Fell um den Operationsbereich entfernt und die Stelle mit

70 % Ethanol desinfiziert. Zunächst wurde dann die Oberhaut aufgeschnitten und von der Bauchdecke getrennt. Anschließend wurde die Bauchdecke entlang der *Linea alba* bis zum Sternum geöffnet und das laterale Segment des linken Leberlappens nach Abbinden entfernt (30 % Hepatektomie). Dann wurden $1,5 \times 10^6$ Stammzellen in 450 μ l PBS mittels einer Insulinspritze (BecktonDickenson, Heidelberg) in die Portalvene appliziert. Anschließend wurde die Wunde mit einem 1 cm^3 großen Gelasponschwamm (Ankerpharm GmbH, Berlin) abgedrückt und nach dem Stillen der Blutung zunächst die Bauchdecke und dann die Haut wieder zusammengenäht.

2.2.4 Transplantation von Stammzellen in die Maus

Zunächst wurden die Tiere wie unter 2.2.3 beschrieben zur Einleitung einer Replikationsarretierung mit 30 mg/kg KG Monocrotalin vorbehandelt. Nach einer 30 % Hepatektomie wurden zunächst die Bauchdecke und dann die Haut zugenäht. Danach wurde die linke Seite der Maus mit einem 1 cm Schnitt eröffnet und mit einem Wattestäbchen die Milz vorsichtig herausgezogen. Nachdem in der Mitte der Milz eine lockere Ligatur gelegt worden war, wurden $7,5 \times 10^5$ Stammzellen mittels einer Insulinspritze (BecktonDickenson, Heidelberg) in die Milz appliziert. Nach Beendigung der Transplantation wurde die Ligatur festgezogen, die Spritze entfernt und zunächst die Bauchdecke dann die Haut wieder zugenäht. Da es sich um immundefiziente Mäuse handelte, wurden die Transplantationen unter der Sterilbank durchgeführt.

2.2.5 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe

Das verwendete Fettgewebe stammte aus Gewebespenden, die während regulärer operativer Eingriffe in der Abteilung Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin des Universitätsklinikums der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg gewonnen wurden. Das Votum der Ethikkommission und die schriftliche Einverständniserklärung der Spenderinnen dazu lagen vor. Das subkutane (human) und peritoneale (human, Ratte) Fettgewebe wurde mit einer kleinen anatomischen Schere in ca. 6 mm^3 große Stücke zerkleinert und in 30 ml DMEM-LG mit 0,075 % (w/v) Collagenase Typl für 30 min bei 37 °C und 120 rpm rotierend inkubiert. Der Collagenase-Verdau wurde durch Zugabe von 5 ml FKS abgestoppt. Zur Entfernung von unverdaulichem Gewebe wurde die Suspension über ein 100 μ m Nygonsieb gefiltert, in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und mit eiskaltem PBS auf

50 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 300 x g, 7 min und 4 °C sedimentiert. Die an der Oberfläche befindlichen Adipozyten und der Überstand wurde verworfen und die Zellen erneut zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das resultierende Pellet wurde in 4 ml PBS aufgenommen, auf 10 ml Percoll (1,077 g/ml) geschichtet und bei 200 x g für 20 min und 4 °C zentrifugiert. Die Interphase, die die Fraktion der mononukleären Zellen enthielt, wurde abgenommen und in 10 ml PBS gewaschen, die Zellen 5 min bei 300 x g und 4°C sedimentiert und das Pellet in 5 ml EM6F resuspendiert. Die Zellzahl wurde ermittelt und die Zellen mit einer Dichte von 200 Zellen/cm² in 150 cm² Kulturflaschen in EM6F ausplattiert und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 und 48 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit PBS gewaschen, um tote und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen. Bei einer Konfluenz von 35-40 % wurden die Zellen trypsinisiert, in FKS mit 10 % DMSO in Kryoröhrchen langsam auf -80 °C heruntergekühlt (1 °C/min) und in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.6 Isolierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark

Das Knochenmark stammte aus Gewebespenden, die während regulärer operativer Eingriffe bei Tibia- und Femurfrakturen in der orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg gewonnen wurden. Das Votum der Ethikkommission und die schriftliche Einverständniserklärung der Spenderinnen dazu lagen vor. Das Aspirat wurde direkt in 30 ml DMEM mit 0,075 % (w/v) Collagenase Typ1 für 30 min bei 47 °C und 120 rpm inkubiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte wie in 2.2.3 beschrieben.

2.2.7 Fluoreszenz-Aktivierte Durchflusscytometrie (FACS)

Zur Bestimmung des Expressionsmusters der Oberflächenantigene wurden die Stammzellen bis zu einer Konfluenz von 40-50 % expandiert, trypsinisiert und zweimal mit PBS gewaschen. Jeweils 100.000 Zellen in 100 µl PBS mit 1 % FKS wurden mit 15 µl des jeweiligen Antikörpers für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 1 ml PBS gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Durchflusscytometrische Analyse erfolgte mit 50.000 Zellen je untersuchtem Oberflächenantigen. Für die Analyse isolierter Hepatozyten nach Stammzelltransplantation wie unter 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben, wurden 400.000 Zellen eingesetzt.

2.2.8 Hepatogene Differenzierung von Stammzellen

Die Stammzellen wurden mit einer Dichte von 300 Zellen/cm² ausplattiert und in EM6F bei 37 °C und 5 % CO₂ expandiert. Alle vier Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Bei einer Konfluenz von etwa 90 % wurde zur Demythelierung der DNA für 24 h 5'-Azacytidine bis zur Endkonzentration von 20 µM zugegeben. Danach erfolgte der Wechsel zum Differenzierungsmedium HGM im Falle von murinen Stammzellen bzw. HHMM im Falle von humanen Stammzellen. Die Zellen wurden weiter bei 37 °C und 5 %CO₂ inkubiert, ein Medienwechsel erfolgte alle vier Tage. Die in den Ergebnissen als nicht differenziert (nd) bezeichneten MSC sind, soweit nicht anders angegeben, drei Tage vor der 5'-Azacytidine-Behandlung bei etwa 50 % Konfluenz verwendet worden.

2.2.9 Osteogene und adipogene Differenzierung

Die Stammzellen wurden wie in 2.2.6 beschrieben expandiert und das entsprechende Differenzierungsmedium bei Erreichen von etwa 90 % Konfluenz zugegeben. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert, ein Medienwechsel erfolgte alle vier Tage.

2.2.10 Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.2.10 Herstellung von Lentiviren

Für die Herstellung des Lentivirus wurden HEK-293 T Zellen mit einer Dichte von 2 x 10⁵ Zellen/cm² in 10-cm Kulturschalen ausplattiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die lentiviralen Expressionsplasmide wurden mittels DNA-CaCl₂-Präzipitation in die HEK-293 T Zellen transient eingebracht. Dazu wurden je 10-cm Kulturschale 20 µg FUGW, 10 µg VSVG, 10 µg Rev-Rsv und 10 µg pMDL g/p RRE in 1,6 ml Aq. dest gemischt, 400 µl 1,25 M CaCl₂-Lösung zugegeben und durch Pipettieren vermischt. Anschließend wurden tropfenweise 2 ml 2 x HBS (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 1,5 mM Na₂HPO₄ pH: 7,1) unter Schwenken zugegeben. Die Präzipitatbildung wurde mikroskopisch kontrolliert, bevor die Lösung auf die Zellen gegeben wurde. Das Medium wurde nach 3 h gewechselt und der Ansatz für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Der Überstand mit den Lentiviren wurde abgenommen, sterilfiltriert (0,45 µm Porengröße) und in der Ultrazentrifuge für 2,5 h und 150.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet

durch Pipettieren in 500 µl PBS gelöst und der Titer bestimmt. Dazu wurde eine 1:10 Reihenverdünnung des Virusstocks in 3 ml Medium mit einer Endkonzentration von 7,5 µg/ml Polybrene hergestellt und diese Ansätze auf eine 6-Well Platte mit HEK-293 T Zellen gegeben. Nach 2-tägiger Inkubation wurde die Infektionseffizienz anhand der Anzahl der fluoreszierenden Zellen bestimmt und der Titer nach folgender Formel bestimmt:

$$X \% \text{ (Prozent der GFP-exprimierenden Zellen)} \times 4 \times 10^5 = X \% \text{ positive Zellen}$$
$$X \% \text{ positive Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{virale Partikel/ml}$$

Zur Bestimmung des Titers in die *Firefly Luciferase*-exprimierenden Zellen wurde eine 1:2 und eine 1:10 Reihenverdünnung des Virusstocks hergestellt und damit die HEK-293 T Zellen infiziert. Nach 2-tägiger Kultur wurde in allen Proben die Luciferaseaktivität in 1×10^5 Zellen mittels des *Luciferase Assay Systems* nach Herstellerangaben bestimmt. Da bis zu einer 1:32-fachen Verdünnung keine signifikanten Messunterschiede auftraten, wurde diese Verdünnung als 100 % Infektionsrate angesehen und daran alle anderen Verdünnungen als X % exprimierende Zellen in obige Formel eingesetzt.

2.2.11 Lentivirale Infektion von Zellen

Um die Infektionsrate mit Lentiviren möglichst gleichmäßig zu halten, wurden die Stammzellen zunächst mit einer Dichte von 300 Zellen/cm² in 150 cm² Kulturflaschen ausplattiert. Bei einer Konfluenz von 30 % wurden 18 ml EM6F mit 7,5 µg/ml Polybrene und ca. 40 Viren/Zelle auf die Zellen gegeben und für 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Infektionsrate wurde fluoreszenzmikroskopisch überprüft und die Zellen dann 2 x mit PBS gewaschen, trypsinisiert und entsprechend der weiteren Versuchsdurchführung ausplattiert.

2.2.12 Fluorometrische Messungen

Die Messung der *Renilla*- und *Firefly Luciferase* Fluoreszenz erfolgte mit dem Luciferase Assay System oder dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System nach Herstellerangaben. Die Messung des GFP erfolgte bei einer Anregung von 485 nm und einer Detektion bei 538 nm in einer schwarzen 96-well-Platte. Dazu wurden die

Zellen zum Zeitpunkt der Messung zunächst trypsinisiert, 3 x mit PBS gewaschen, die Zellzahl bestimmt und die entsprechende Zellzahl in die Messung eingesetzt.

2.2.13 Aktivierung des PCK Promotors mittels cAMP nach transienter Transformation

Um zu überprüfen, ob der leberspezifische PCK-Promotor in hepatogen differenzierten Stammzellen aktiv war und durch cAMP weiter aktiviert werden konnte, wurden MSC aus dem peritonealen Fettgewebe zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung transient mit dem Luciferase-Reportergenkonstrukt pGL-rPCK -493/+33 in Gegenwart von Effectene transfiziert. Hierzu wurden pro 4-cm Kulturschale 0,3 µg des Plasmids zusammen mit 0,9 µg des pRL-SV40 Vector zum internen Abgleich der Transformationseffizienz eingesetzt. Die Plasmid-DNA wurde mit 71 µl EC gemischt, 9,6 µl Enhancer (Verhältnis µg DNA : µl Enhancer = 1:8) dazugegeben, durch Vortexen gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 14,5 µl Effectene (Verhältnis µg DNA : µl Effectene = 1:12) wurde der Ansatz erneut durch Vortexen gemischt und für 1 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 900 µl HGM zu den 100 µl Transformationsansatz gegeben und nach Entfernen des alten Kulturmediums zu den Zellen gegeben. Nach 15 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und ein Mediumwechsel mit 3 ml HGM durchgeführt. Die Stimulation der Zellen mit 50 µM cAMP erfolgte 12 h vor der Messung. Die Messung der *Renilla*- und *Firefly*-Luciferaseaktivität erfolgte 48 h nach der Transfektion mit kommerziellen Kits entsprechend der Herstellerangaben. Die Zunahme der durch cAMP stimulierten Luciferaseaktivität unter Kontrolle des PCK1-Promotors gegenüber der unstimulierten Aktivität wurde unter Abgleich gegen die *Renilla* Luciferaseaktivität unter Kontrolle des konstitutiv aktiven SV40-Promotors nach folgender Formel errechnet:

$$\frac{\left(\frac{FF_{+c}}{RL_{+c}}\right)}{\left(\frac{FF_{-c}}{RL_{-c}}\right)} \times 100 = \% \text{ relative Zunahme}$$

FF_{+c/-c} = PCK vermittelte Firefly Luciferase Expression mit/ohne cAMP Aktivierung

RL_{+c/-c} = SV-40 vermittelte Renilla Luciferase Expression mit/ohne cAMP Aktivierung

2.2.14 Bestimmung der Harnstoffsyntheserate

Die Harnstoffsynthese ist eine spezifische hepatozytäre Leistung und diente als ein funktionelles Kriterium der hepatogenen Differenzierung von MSC. Der Harnstoff wurde in 1 ml Mediumüberstand 24 h nach einem Mediumwechsel an verschiedenen Tagen der Differenzierung bestimmt und auf die Zellzahl normiert. Der Nachweis beruht auf der Methode von Wybenga et al. (1971). Dabei ergibt Harnstoff mit Diacetylmonoxim in Gegenwart von Thiosemicarbazid in saurer Umgebung einen orange-rosa Farbumschlag, der bei 540 nm gemessen werden kann. Dazu wurden Aq. dest., Mixed Colour Reagent und Mixed Acid Reagent im Verhältnis 1:1:1 vermischt. Zu 1,25 ml dieser Lösung wurden 40 µl des zu untersuchenden Überstandes gegeben. Nach 10 minütiger Erhitzung auf 96 °C und Abkühlung auf Eis wurden die Proben zusammen mit Standards bekannter Harnstoffkonzentrationen (Leerwert; 0,156 µg/ml; 3,125 µg/ml und 6,25 µg/ml) im Photometer vermessen. Die Harnstoffsyntheserate der differenzierten Stammzellen wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Absorption OD}_{540} \text{ Probe} : \text{Eichgerade (OD}_{540} / \mu\text{g/ml Harnstoff)} &= \mu\text{g/ml Harnstoff} \\ \mu\text{g/ml Harnstoff} \times 10.000 \text{ Zellen} : \text{Zellzahl} &= \mu\text{g/ml Harnstoff}/10.000 \text{ Zellen} \\ \mu\text{g/ml Harnstoff}/10.000 \text{ Zellen} : \text{Molmasse Harnstoff } [\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1} / \text{mol}] &= \text{mol} \\ &\text{Harnstoff}/10.000 \text{ Zellen}/24 \text{ Std.} \end{aligned}$$

Mixed Colour Reagent: 0,14 % Diacetylmonoxim; 0,035 % Thiosemicarbazid in Aq. dest.

Mixed Acid Reagent: 20 % Schwefelsäure; 0,0012 % Eisen III-Chlorid; 0,025 % Phosphorsäure in Aq. dest.

2.2.15 Klonierung des Lentivirus

Transgene wurden durch lentiviralen Gentransfer stabil in die Stammzellen eingebracht. Der ursprüngliche FUGW-Vektor besitzt das Transgen EGFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors. Weitere Konstrukte wurden hergestellt, indem der Ubiquitin-Promotor gegen das humane PCK1-Promotorfragment hPCK -457/+65 oder das murine Promotorfragment rPCK -493/+33 bzw. gegen ein 8 x TCF/LEF-Bindemotiv (M50) und ein mutiertes, inaktives 8 x TCF/LEF-Bindemotiv (M51) ausgetauscht. In den Ubiquitin- und PCK-Promotorkonstrukten wurde zudem das

EGFP gegen RFP als Reporter gen ausgetauscht. Die Vektoren M50 und M51 enthielten die Firefly Luciferase als Reporter gen. Für die Klonierungen der verschiedenen Konstrukte wurden die Zielgene mittels PCR aus den verschiedenen Vektoren amplifiziert, um passende Restriktionsstellen einzufügen. Die PCR zur Amplifikation der entsprechenden Zielgene wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

100 ng Vektor in 1 µl TE-Puffer
 3 µl 10 mM dNTP's (2,5 mM/NTP)
 1 µl je Primer (25 pmol)
 1 µl *Pfu* DNA Polymerase (2,5 U/µl, recombinant)
 3,5 µl 10 x Puffer mit MgSO₄
 24,5 µl Nuclease-freies H₂O

PCR-Profil:

5 min 95°C, Deckelheizung = 105°C
 25 Zyklen:
 35 sek., 95°C
 35 sek. Annealing (s. Tabelle 5)
 Elongation bei 72 °C (s. Tabelle 5)
 Finale Elongation 2 min, 72°C
 Hold 4°C

Der Ansatz wurde zweimal parallel gefahren und die PCR Ansätze dann nach Herstellerangaben mit dem MSB Spin PCRapace Kit aufgereinigt. Eluiert wurde in 75 µl, wovon 5 µl zur Schätzung der Menge auf einem 1 % Agarosegel aufgetragen wurden. Anschließend folgte die doppelte Restriktion des Amplifikates und des Vektors getrennt nach folgendem Schema:

| | |
|---|--|
| Vektorverdau | Verdau der Amplifikate |
| 3 µg Vector in 10 µl Nuclease-freiem H ₂ O | 70 µl PCR Amplifikat |
| 1.5 U/µg DNA pro Enzym (s. Tab. 6) | 10 U/µg Amplifikat pro Enzym (s. Tab. 6) |
| 10 x Puffer (Art und Menge s. Tabelle 6) | |
| ad 30 µl Nuclease-freies H ₂ O | ad 100 µl Nuclease-freies H ₂ O |

Die Ansätze wurden dann im Wasserbad für 2 h und 37 °C inkubiert. Dem Ansatz mit dem Vektor wurden nach 2 h noch 3 µl 10 x CIAP Puffer und 3 µl CIAP (1 U/µl, Fermentas) zur Dephosphorylierung zugegeben und weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Alle Ansätze wurden danach auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt. Die unter dem UV-Tisch ausgeschnittenen Banden wurden nach Herstellerangaben mit dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit aufgereinigt und in 20 µl eluiert. Die Ligation folgte folgendem Schema:

20 µl *Insert*
 2 µl Vektor
 2 µl T4 DNA-Ligase
 3 µl 10 x T4 Puffer
 3 µl PEG-4000

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C im Thermocycler mit Deckelheizung bei 35 °C. Vom Ligationsansatz wurden 3 µl auf einem 1 % Agarosegel auf erfolgte Ligation überprüft und anschließend in chemisch kompetente (Inoue Methode) *E. coli* DH5-α mittels Hitzeschock transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf 5 LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR unter denselben Bedingungen wie die PCR-Amplifikation auf Vorhandensein des Inserts hin überprüft. Von positiven Kolonien (max. 10 Stück) wurde eine 5 ml Über-Nacht-Kultur angelegt und die Plasmide nach Herstellerangaben mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini Two aufgereinigt und mittels Restriktionsverdau das Insert und die Orientierung der Integration überprüft. Positiv identifizierte Klone wurden sequenziert (MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland), die Primer für die Sequenzierung sind in Tabelle 5 aufgeführt. Positive Klone wurden genutzt, um nach Herstellerangaben mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit größere Plasmidmengen zu gewinnen.

| Name | Sequenz 5'→3' | T _{Anneal} | t _{Elongation} |
|------|---|---------------------|-------------------------|
| M50 | S: CAACCACCAGGATCCGCGAGATCAAAGGGGGTA AS: CAACCACCAGAATTACATTACACGGCGAT | 65 °C | 2 min |
| M51 | S: CAACCACCAGGATCCGCGAGGCCAAAGGGGGTA AS. M50 | 65°C | 2 min |

| | | | |
|--------------|---|-------|-------|
| PCK | S: CACCTTAATTAAGGGTGCATCCTTCCC AS: CCACGGATCCGAGATCTACAG | 58 °C | 1 min |
| Seq.Prom. | S: GGACAGCAGAGATCCA AS: GCGTGGATGGCGTCT | -- | -- |
| Seq.Reporter | S: ACACCGACTCTAGCTAGA AS: GGTAGAATTATCTAGA | -- | -- |

Tabelle 5: PCR Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierungen

| Name | Enzyme | Puffer |
|------|--|----------------------|
| FUGW | 2-fach <i>Bam</i> HI, 1-fach <i>Eco</i> RI | 2 x Tango™ |
| FUGW | <i>Bam</i> HI, <i>Pac</i> I (NEB) | NEB Puffer 4 mit BSA |
| M50 | 2-fach <i>Bam</i> HI, 1-fach <i>Eco</i> RI | 2 x Tango™ |
| M51 | 2-fach <i>Bam</i> HI, 1-fach <i>Eco</i> RI | 2 x Tango™ |
| PCK | <i>Bam</i> HI, <i>Pac</i> I (NEB) | NEB Puffer 4 mit BSA |
| RFP | 2-fach <i>Bam</i> HI, 1-fach <i>Eco</i> RI | 2 x Tango™ |

Tabelle 6: Restriktionsenzyme für den Plasmidverdau

2.2.16 RT-PCR

Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während der Differenzierung mit PBS gewaschen, trypsinisiert und die RNA mit dem SV Total RNA Isolation System nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der RNA wurde im Photometer bestimmt und 1 µg der RNA mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

1 µl cDNA (40 ng)
0,5 µl MgSO₄
12,5 µl 2 x PCR Master Mix
1 µl je Primer (25 pmol)
9 µl Nuclease-freies H₂O

PCR-Profil:

2 min 96 °C, Deckelheizung 105 °C
Zyklen (s. Tabelle 4)
30 sek. 96 °C
30 sek Annealing (Temp. s. Tabelle 4)
35 sek. 72 °C
Final 2 min 72 °C
Hold 4°C

Die PCR Ansätze wurden in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt, die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt und bei 260 nm auf dem Leuchttisch photographiert.

2.2.17 Zellyse und Proteinbestimmung

Sämtliche Zellysate wurden mit RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 50 mM Tris-HCl, 4 % *complete Protease Inhibitor Cocktail* (Roche), pH 8,8) hergestellt. Dazu wurden die trypsinisierten und pelletierten Zellen gewogen, im vierfachen Volumen RIPA resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurden die Proben in der Tischzentrifuge für 10 min, 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Von den Proben wurde eine 1:10 Verdünnung in 0,9 % NaCl hergestellt und 10 µl dieser Verdünnung zu 200 µl Reagenzlösung (1 Teil Copper II + 49 Teile Bichinonic acid solution, Sigma) gegeben. Dieser Ansatz wurde zusammen mit dem Proteinstandard (Leerwert; 0,2 µg/µl; 0,4 µg/µl; 0,8 µg/µl; 1 µg/µl und 2 µg/µl) in einer 96-well Platte für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 655nm.

2.2.18 SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinlysaten erfolgte je nach Größe des zu detektierenden Proteins in 10- und 12 % Polyacrylamidgelen (s. Tab. 7). Die Proteine wurden nach der Auftrennung für 2 h und 180 mA auf eine PVDF-Membran geblottet. Für HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurden die Blots mit 8 % Magermilch, 3 % BSA und 1 % CFG in TBS/Tween-20, pH 7,2 für 3 Std. geblockt. Für Infrarot-Chromophoren-konjugierte Sekundärantikörper wurden die Blots in 10 % Magermilch und 5 % BSA in PBS, pH 7,2 für 3 h geblockt. Die Primärantikörper wurden in 3 % BSA in PBS verdünnt (s. Tab. 2) und für 2 h bei RT inkubiert. Die Sekundärantikörper wurden in

2 % BSA verdünnt (s. Tab. 3) und für 1 h bei RT inkubiert. Die Entwicklung der HRP-konjugierten Sekundärantikörper erfolgte nach Herstellerangaben mit dem ECL™ Western Blotting Detection Kit und dem Syngene Imaging System. Die Infrarot-Chromophoren-konjugierten Sekundärantikörper wurden direkt mit dem Li-Cor Odyssey System gescannt.

| Gel | H ₂ O | Polyacrylamid ¹ | 10 %SDS | Tris ² | TEMED | 10 %APS |
|---------------|------------------|----------------------------|---------|-------------------|-------|---------|
| Sammelgel 7 % | 2,5 ml | 1,15ml | 50 µl | 1,25 ml | 3 µl | 25 µl |
| Trenngel 10 % | 6,0 ml | 5,0 ml | 150 µl | 3,75 ml | 8 µl | 75 µl |
| Sammelgel 9 % | 2,2 ml | 1,5 ml | 50 µl | 1,25 ml | 3 µl | 25 µl |
| Trenngel 12 % | 5,0 ml | 6,0 ml | 150µl | 3,75 ml | 8 µl | 75 µl |

Tabelle 7: Zusammensetzung der SDS Acrylamidgele

¹ = Acrylamid – Bis (29:1), 30 % (w/v); Serva (Heidelberg, Deutschland)

² = Sammelgel: 0,5 M Tris pH 6,8; Trenngel: 1,5 M Tris pH 8,8

2.2.19 Histologische Methoden

2.2.19 Periodic Acid-Schiff's Staining (PAS)

Die Synthese und Speicherung von Glykogen ist eine typische Funktion von Hepatozyten und dient unter anderem zum funktionellen Nachweis der hepatogenen Differenzierung von Stammzellen. Zum Nachweis der Glykogenspeicherung wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der hepatogenen Differenzierung mit der PAS-Methode gefärbt. Hierzu wurden die Zellen auf der Kulturschale zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit -20 °C kalten Methanol/Aceton (Verhältnis 1:1) bei 4°C fixiert. Nach zweimaligen Waschen mit Aq. dest. wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 1 % Perjodsäure inkubiert und anschließend erneut zweifach gewaschen. Die Farbreaktion erfolgte dann durch Inkubation der Zellen mit Schiff's Reagenz für 15 min bei RT. Anschließend wurden die Zellen mit lauwarmem Aq. dest. gewaschen.

2.2.20 Sudan III Färbung

Zum Nachweis der adipogenen Differenzierung wurden intrazelluläre Lipideinlagerungen zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mit Sudan III

gefärbt. Dazu wurde eine gesättigte Sudan III Lösung in 70 % Ethanol hergestellt, filtriert und auf die mit PBS gewaschenen Zellen gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen.

2.2.21 Alizarin-Red-S Färbung

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden extrazelluläre Calciumphosphat-Präzipitate auf der Zelloberfläche zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung mit Alizarin-Red-S angefärbt. Eine 1 %ige Alizarin-Red-S Lösung in Aq. dest (pH 6,5) wurde nach zweimaligen Waschen der Zellen direkt für 10 min bei RT die Zellen gegeben. Danach wurde der Farbstoff entfernt und die Zellen fünfmal mit Aq. dest. gewaschen.

2.2.22 Immuncytochemie

Für immuncytochemische Färbungen wurden die Zellen auf 16 mm Deckgläschen ausplattiert und kultiviert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Deckgläschen entnommen, mit PBS gewaschen und anschließend mit eiskaltem Methanol für 20 min bei -20 °C fixiert. Danach wurde das Methanol abgenommen und die fixierten Zellen bei RT luftgetrocknet. Die Fixierung mit PFA (4% w/v) erfolgte für 20 min bei 4 °C, danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit 0,1 % Triton X-100 (v/v) für 5 min bei RT permeabilisiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten bei Methanol- und PFA-fixierten Zellen gleichermaßen. Die Zellen wurden für 1 h bei RT mit 1,5 % BSA in PBS blockiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte in 1 % BSA in PBS in den angegebenen Verdünnungen (s. Tab. 2) für 1 h bei RT. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper in den angegebenen Verdünnung (s. Tab. 3) in 1 % BSA in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Kernfärbung mit DAPI (4 nM, Invitrogen Deutschland). Die Zellen wurden anschließend zunächst dreimal in Aq. dest., dann dreimal in Ethanol getaucht und nach Lufttrocknung bei RT eingedeckelt.

2.2.23 Immunhistochemische Färbungen

Zum Nachweis der transgenen Expression von GFP oder humanen Markern in Lebern von mit MSC transplantierten Tieren wurde nach Anästhesie mit Forene die Bauchhöhle eröffnet, die untere Hohlvene durchtrennt und über die Portalvene die Leber mit PBS blutfrei gespült. Die Leber wurde entnommen, für vier Tage in 5 % Formalin eingelegt und dann paraffiniert. Es wurden 3 µm dicke Schnitte angefertigt, diese entparaffiniert (2 x 5min Aceton, 2 x 3 min 96 % Ethanol, 3 min 70 % Ethanol, 3 min 50 % Ethanol, 2 x 2 min Aq. dest.) und für 10 min bei 96 °C demaskiert. Für die HepPar1- und Albumin-Färbungen wurden die Schnitte in Citratpuffer (10 mM tri-Natriumcitrat, pH 6,0) und für die GFP-Färbungen in Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 0,05 % Tween-20; pH 9,0) demaskiert. Nach dem Abkühlen wurden die Schnitte für 2 h in einer feuchten Kammer bei RT blockiert (3 % BSA; 1 % Gelatine; 0,1 % Tween-20 und 0,05 % Triton X-100 in PBS, pH 7,2) und 3 x 10 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Primärantikörper wie in Tabelle 2 beschrieben verdünnt (2 % BSA in PBS, pH 7,2), die Schnitte mit dieser Lösung bedeckt in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert (anti-HepPar1 90 min, anti-Albumin 45 min, anti-GFP 60 min) und dann 3 x 10 min in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Peroxidase-Blockierung mit 3,5 % H₂O₂ in Aq. dest. für 30 min im Dunkeln und erneutes Waschen 5 x 5 min in PBS. Der mit HRP konjugierte Sekundärantikörper wurde wie in Tabelle 3 beschrieben verdünnt (2 % BSA in PBS, pH 7,2), die Schnitte damit bedeckt und in einer feuchten Kammer für 60 min inkubiert und erneut 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Für die Farbreaktion wurden die Schnitte mit der nach Herstellerangaben zubereiteten Entwicklungslösung bedeckt und etwa 15 min bis zum Einsetzen der Farbreaktion bei RT inkubiert. Nachdem die Schnitte 2 x 5 min in PBS gewaschen worden waren, wurden sie für die Kernfärbung 15 sec in Hämalaun getaucht und für 5 min im lauwarmen Aq. dest. nachgebläut. Anschließend wurden die Schnitte ein letztes Mal 5 min in PBS gewaschen und mit Aquatex® eingedeckelt.

2.2.24 Enzymatischer CD26 Nachweis

Der Nachweis des membranständigen CD26 (Dipeptidylpeptidase/DPP IV) in der Ratte erfolgte enzymatisch an Kryoschnitten. Da die CD26^{-/-} Fischerratten kein CD26 in der Zellmembran exprimieren können, war es möglich, die eingebrachten MSC aus den CD26 wt Fischerratten anhand dieses Oberflächenproteins zu identifizieren. Dazu wurde den Tieren wie unter 2.2.19 beschrieben die Leber entfernt und langsam

(1 °C/min) auf -80 °C abgekühlt. Es wurden 5 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt und für 20 min bei RT luftgetrocknet. Danach erfolgte die Fixierung der Schnitte bei -20 °C für 10 min in Methanol/Aceton (1:1), nach erneutem Trocknen der Schnitte an der Luft erfolgte die enzymatische Färbung. Dazu wurden die Schnitte mit dem Färbesubstrat (2 ml 100 mM Tris maleate, pH 6.5 mit 1 mg gly-pro-methoxy-β-naphtylamide und 2 mg fast blue) überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. Die enzymatische Umsetzung des gly-pro-methoxy-β-Naphtylamid durch die DPP IV bewirkt einen roten Niederschlag an der Zellmembran. Anschließend wurden die Schnitte 3 x 5 min in PBS gewaschen wie unter 2.2.19 beschrieben die Kerne gefärbt und mit Aquatex® eingedeckelt.

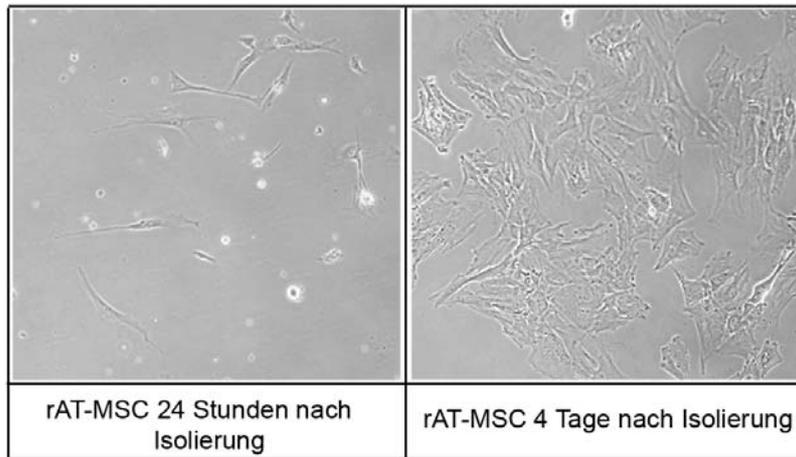
3. Ergebnisse

3.1 Leberregeneration mit mesenchymalen Stammzellen aus dem peritonealen Fettgewebe der Ratte im syngenem Transplantationsmodell

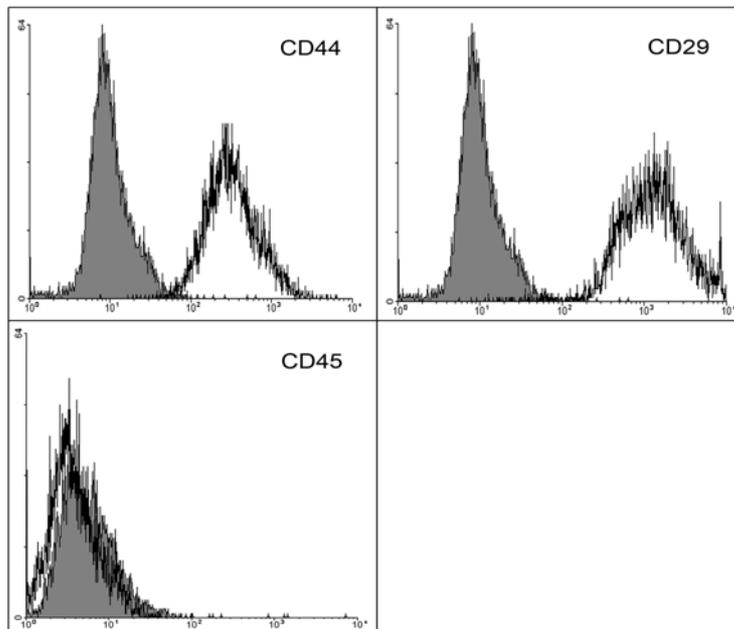
3.1.1 Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus dem peritonealen Fettgewebe der Ratte.

Die Fraktion der Mononukleären Zellen aus peritonealem Fett von CD26^{-/-} Fischer Ratten enthielt eine Zellpopulation, die Plastikadhärenz aufwies. Weiterhin zeigten die Zellen das für MSC typische Muster der Koloniebildung und eine spindelförmige Morphologie (Abb. 7A). Sie exprimierten die mesenchymalen Oberflächenantigene CD29 und CD44, nicht jedoch das hämatopoetische Oberflächenantigen CD45 (Abb. 7B, n=6). Nach Zugabe von adipogenem Differenzierungsmedium wiesen die Zellen Eigenschaften von Adipozyten wie die Einlagerung von Lipiden auf, wie mittels der Sudan III-Färbung gezeigt werden konnte. In osteogenem Differenzierungsmedium bildeten die Zellen extrazelluläre Calciumphosphat-Präzipitate, wie mittels der Alizarin Rot-Färbung nachgewiesen wurde (Abb. 7C, n=4). Die adipogene und osteogene Differenzierung wurde über den Kulturverlauf zudem durch semiquantitative RT-PCR nachgewiesen. Unter adipogenen Differenzierungsbedingungen exprimierten die Zellen den Marker Lipoproteinlipase (LPL), unter osteogenen Bedingungen den Marker Osteonectin (ON). Die Expression der GAPDH diente als interne Referenz (Abb. 7C, n=4). Die Morphologie der isolierten Zellen, die Expression von Oberflächenantigenen sowie die Plastizität der Zellen sind typische Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen (30).

A



B



C

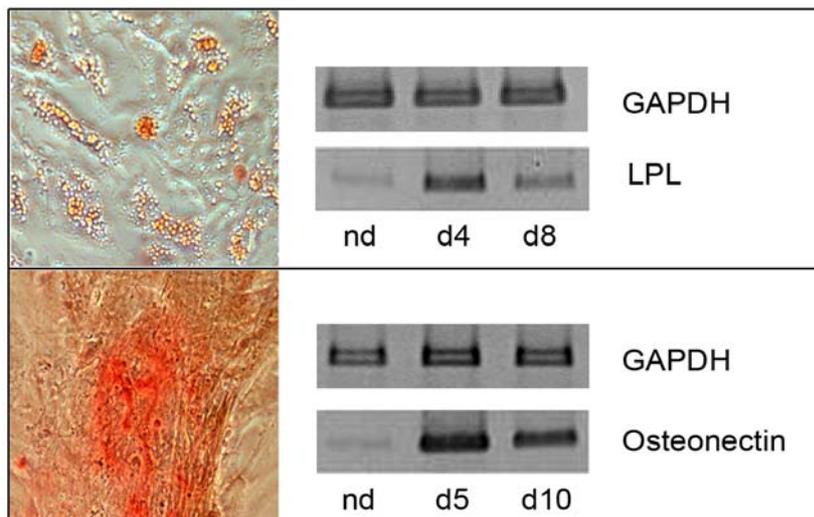


Abbildung 7: Charakterisierung der rAT-MSC. (A) Morphologie von rAT-MSC nach 24-stündiger und 4-tägiger Kultur. (B) Expression von Oberflächenantigenen der rAT-MSC aus der ersten Passage mittels FACS-Analyse. Die Zellen wurden mit FITC- bzw. PE-konjugierten Antikörpern gegen das entsprechende Oberflächenantigen inkubiert. Graue Fläche unter der Kurve – IgG Isotypkontrolle, weiße Fläche unter der Kurve – spezifischer Antikörper. (C) Multiples Differenzierungspotential der rAT-MSC. In unifferenzierten (nd) Zellen wurden nach drei Kulturtagen, in osteogen und adipogen differenzierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten die Expression des Adipozytenmarkers LPL (Lipoproteinlipase) bzw. des Osteoblastenmarkern ON (Osteonectin) mittels RT-PCR analysiert. Die konstitutiv exprimierte GAPDH diente als interne Kontrolle. Lipideinlagerungen wurden mit Sudan III nach 8-tägiger Kultivierung in adipogenem und Calciumphosphat-Präzipitate mit Alizarin Rot nach 10-tägiger Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium nachgewiesen (Vergrößerung 100x).

3.1.2 Funktionalität von *in vitro* hepatogen differenzierten rAT-MSC

Für die funktionelle Charakterisierung der hepatogen differenzierten rAT-MSC wurden diese bis zu 90 %iger Konfluenz kultiviert und anschließend wie unter 2.2.8 beschrieben differenziert. Während des Differenzierungsverlaufes über 21 Tage wechselte die zunächst Fibroblasten ähnliche Morphologie der rAT-MSC zu einer für epitheliale Zellen typischen polygonalen Morphologie (Abb. 7A). Mit der PAS-Methode wurde zunächst die Fähigkeit der Zellen zur Glykogensynthese und –speicherung, eine typische Stoffwechsellistung von Hepatozyten, an den Tagen 7, 14, 21 und 28 der Kultur im Differenzierungsmedium überprüft. Zu Beginn waren nur geringe Mengen an Glykogen nachzuweisen, wohingegen am Ende der Differenzierung deutliche Glykogeneinlagerungen zu erkennen waren (Abb. 8A). Zu den gleichen Zeitpunkten wurde die Expression des mesenchymalen Markers *α-smooth muscle actin* (α -SMA) und des hepatozytären Markers HepPar1 immunocytochemisch untersucht. Während α -SMA über den Kulturverlauf sukzessive abnahm und nach 28 Tagen im hepatogenen Differenzierungsmedium nicht mehr nachweisbar war, wurde HepPar1 zunächst nicht exprimiert, nahm aber während der Kultur stetig zu und wurde nach 28 Tagen im Differenzierungsmedium in fast allen Zellen exprimiert (Abb. 8B).

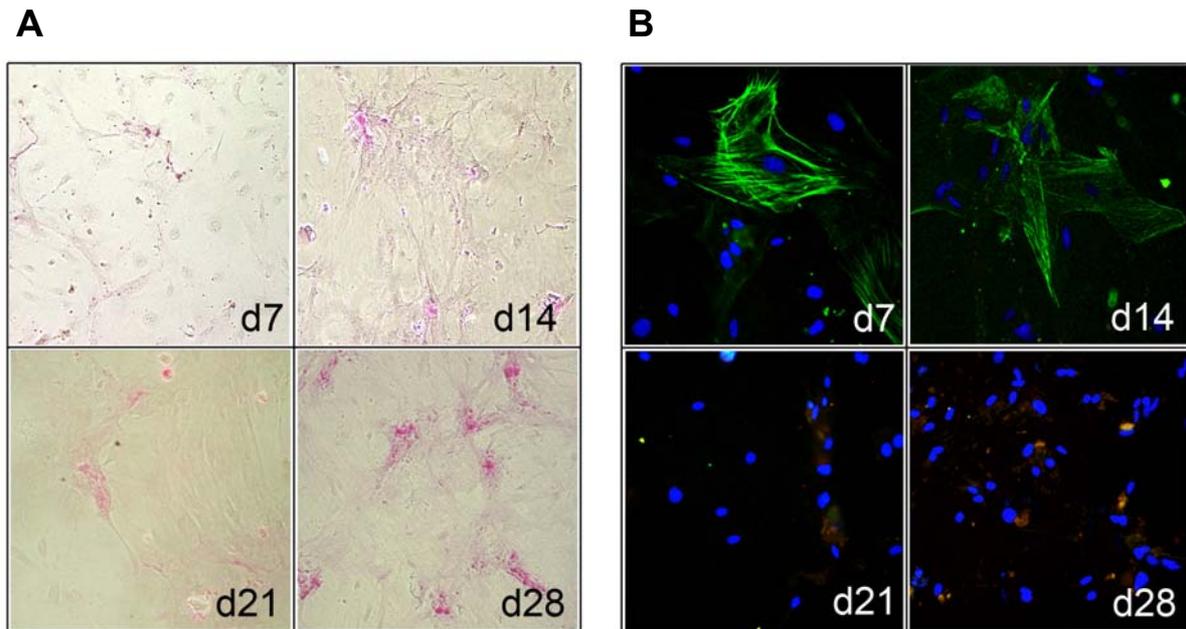


Abbildung 8: Hepatozytäre *in vitro* Differenzierung von rAT-MSC. (A) PAS-Färbung von Glykogeneinlagerungen nach 7, 14, 21 und 28 Tagen in hepatogenem Differenzierungsmedium. (B) Immunocytochemischer Nachweis der Expression des mesenchymalen Markers α -SMA (grün) und des hepatozytären Markers HepPar1 (rot) nach 7, 14, 21 und 28 Tagen in hepatogenem Differenzierungsmedium. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau). (Vergrößerung 100x)

Eine weitere für Hepatozyten typische Stoffwechsellistung ist die Detoxifikation von Ammoniak durch die Harnstoffsynthese. Der Harnstoffgehalt wurde im Überstand der Zellkultur nach 7, 14, 21 und 28 Tagen im Differenzierungsmedium ermittelt. Zu Beginn der Differenzierung der rAT-MSC war kein Harnstoff nachweisbar, mit fortschreitender Differenzierung nahm die Syntheseleistung der Zellen jedoch zu und hatte nach 2-3 Wochen der Differenzierung ein Maximum erreicht. Am Ende des Differenzierungsverlaufes nahm die Syntheseleistung wieder ab, war aber dennoch deutlich höher als in undifferenzierten Zellen (Abb. 9A, n=4). Änderungen in der Expression von für Stammzellen, Lebervorläuferzellen und Hepatozyten typischen Genen während der Differenzierung von rAT-MSC zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium durch semiquantitative RT-PCR analysiert (Abb. 9B). Der Stammzellmarker Nestin und die Hepatozytenprogenitor-Zellmarker Connexin 43 (CX43), alpha-Fetoprotein (AFP) und Cytokeratin 7 (CK7) (114) wurden schon in undifferenzierten Zellen exprimiert. Der Progenitor-Zellmarker Cytokeratin 19 (CK19) war nach einer Woche nachweisbar.

Transkripte der Marker differenzierter Hepatozyten, wie das Enzym des Xenobiotikastoffwechsles Cytochrom P450 Subtyp 1A1 (CYP1A1), das Kontrollenzym der Glukoneogenese PCK1, das hepatozytenspezifische Gap Junction Protein Connexin 32 (CX32), der epitheliale Marker Cytokeratin 18 (CK18), das Plasmaprotein Albumin und die Dipeptidylpeptidase IV (CD26), nahmen im Verlauf der Kultur bis zu 28 Tagen im Differenzierungsmedium zu. Die Expression der mRNA des *Forkhead transcription factor FoxM1B* (FoxM1), welcher eine zentrale Rolle in der Leberregeneration hat (115), wurde bereits in undifferenzierten rAT-MSC exprimiert und war über den gesamten Kulturverlauf nachweisbar. Das mRNA-Expressionsmuster während der Differenzierung von rAT-MSC zeigte eine Veränderung vom Stammzellcharakter zu einem epithelialen, hepatozytären Phänotyp unter den verwendeten Kulturbedingungen.

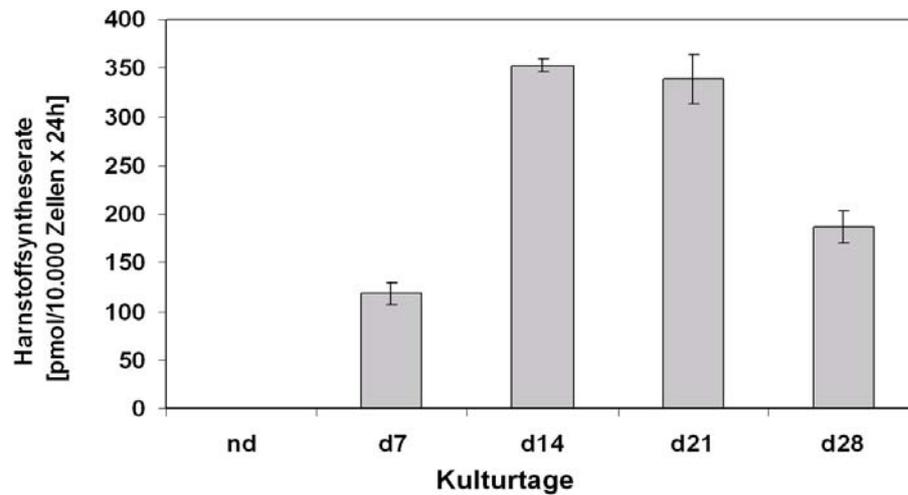
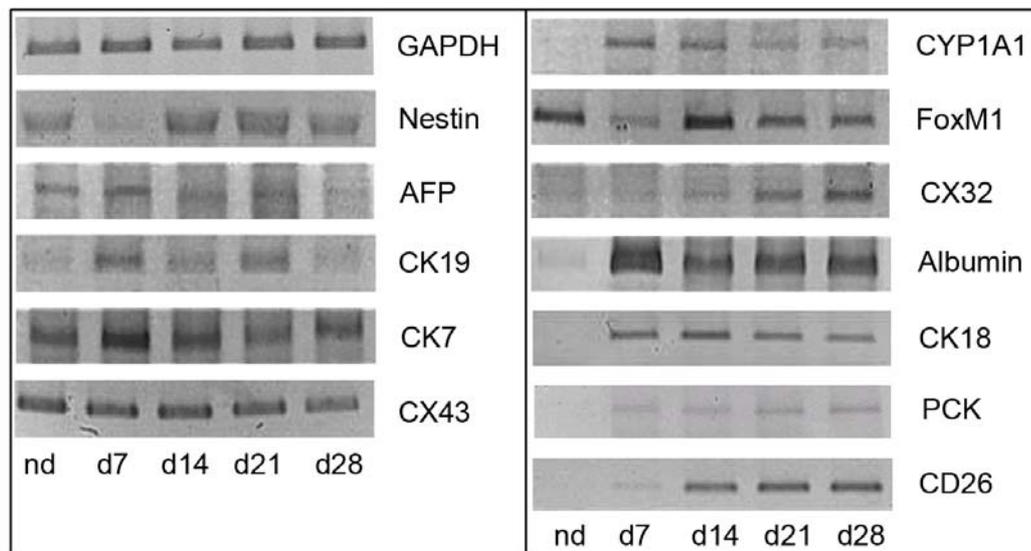
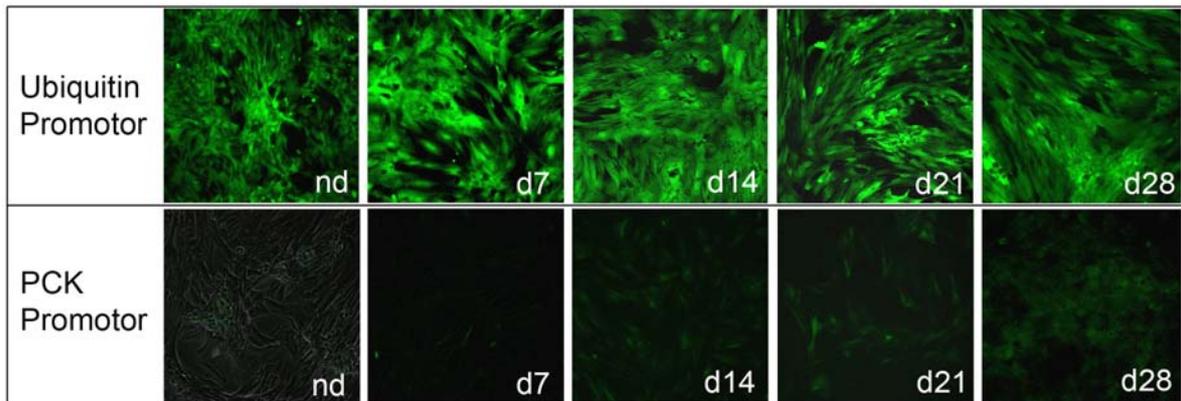
A**B**

Abbildung 9: Stoffwechsel und Genexpressionsmuster in rAT-MSC während der hepatogenen *in vitro* Differenzierung. (A) Bestimmung der Harnstoffsynthese im Kulturüberstand vor (nd) und während der Differenzierung zu den angegebenen Tagen (d). (B) mRNA-Expression von Hepatozytenvorläufer- und Hepatozyten-spezifischen Transkripten. Gesamt-RNA wurde aus undifferenzierten (nd) und aus kultivierten Zellen zu den jeweils angegebenen Tagen (d) gewonnen. RNA-Transkripte, typisch für die frühe (Nestin, AFP, CK19, CK7 und CX43) und späte (CYP1A1, FoxM1, CX32, Albumin, CK18, PCK1 und CD26) hepatozytäre Differenzierung wurden während des Kulturverlaufes unterschiedlich exprimiert. Die konstitutiv exprimierte GAPDH diente als interne Kontrolle.

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der hepatogen differenzierten rAT-MSC wurde die Aktivierung des hepatozytenspezifischen PCK1-Promotors untersucht. In Zeiten der Nahrungskarenz wird die Glukoneogenese durch die Erhöhung der Expression der PCK1 in Hepatozyten stimuliert. Dies erfolgt über die transkriptionelle Aktivierung des PCK1-Genpromotors unter dem Einfluss von Glukagon und dem sekundären Botenstoff cAMP, die ein leberspezifisches Set an Transkriptionsfaktoren erfordert (116). Somit erfordert die Aktivierung des PCK1-Promotors ein hohes Maß der hepatozytären Differenzierung. In rAT-MSC wurde das GFP-Reportergen unter der Kontrolle des PCK1 Genpromotorfragments von -493/+33 (117) stabil durch lentivirale Infektion eingebracht. Die Expression von GFP war in nicht differenzierten Zellen kaum nachweisbar, stieg aber mit der Differenzierung bis zum Tag 21 kontinuierlich an. Zum Vergleich wurden rAT-MSC mit dem GFP-Reportergen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Ubiquitinpromotors lentiviral infiziert. Erwartungsgemäß wurde GFP auf einem gleich hohen Niveau über den gesamten Kulturverlauf nachgewiesen (Abb. 10A). Dieses Ergebnis wurde mittels *Western Blot* Analyse bestätigt (Abb. 10B). Vinculin diente als Ladungskontrolle.

A



B

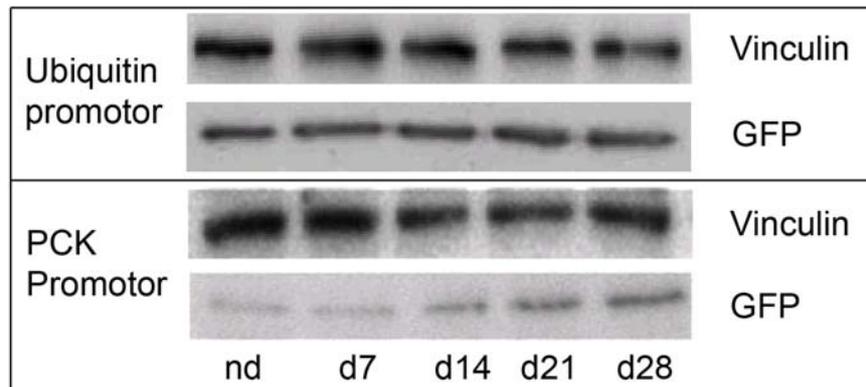


Abbildung 10: Aktivierung des hepatozytenspezifischen PCK1 Genpromotors in rAT-MSC während der hepatogenen *in vitro* Differenzierung. (A) Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der GFP-Expression unter Kontrolle des konstitutiv aktiven Ubiquitin-Promotors oder des PCK1-Promotors nach lentiviralem Gentransfer (Vergrößerung 100x). Die Infektionseffizienz betrug für beide Transgene etwa 90 %. (B) Nachweis der GFP-Expression durch *Western Blot*-Analysen (25 µg Gesamtprotein) in undifferenzierten (nd) und in bis zu den angegebenen Zeitpunkten in hepatogenem Differenzierungsmedium kultivierten (d) rAT-MSC. Vinculin diente als Ladungskontrolle.

Da der PCK1-Promotor durch cAMP stimuliert werden kann, wurde die Zunahme der Luciferaseaktivität unter Kontrolle des PCK1-Promotors im *Dual Luciferase Assay* nach Stimulation der Zellen mit cAMP untersucht. Dazu wurde die *Firefly Luciferase* unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotorfragments -493/+33 (pGL-PCKprom-493/+33) mit der *Renilla Luciferase* (pRL-SV40) transient zu unterschiedlichen

Zeitpunkten der Kultur in hepatogen differenzierte rAT-MSC kotransfiziert. Ohne und nach Stimulation der rAT-MSC mit 50 μ M cAMP wurde die Aktivität als Maß der Expression der *Firefly Luciferase* bestimmt (Abb. 11). Die *Luciferase (Firefly)* Aktivität wurde gegen die Transfektionseffizienz (*Renilla*) abgeglichen. Die nicht stimulierte Aktivität der PCK1-Promotor-abhängigen *Firefly* Expression wurde auf 100 % gesetzt. In zwei unabhängigen Experimenten, jeweils im Doppelansatz, stimulierte cAMP die Aktivität zu allen gemessenen Zeitpunkten. In den beiden Experimenten war die Stimulation der Aktivität am 7. bzw. 14. Tag nach Differenzierungsbeginn am höchsten. Zu späteren Zeitpunkten war die Stimulation des PCK1-Promotors durch cAMP wieder niedriger. Dies zeigt, dass in hepatogen differenzierten rAT-MSC der PCK1-Promotor durch cAMP physiologischerweise reguliert wird. Diese Fähigkeit nimmt jedoch mit andauernder Kultur wieder ab, eine typische Eigenschaft kultivierter primärer Hepatozyten (118).

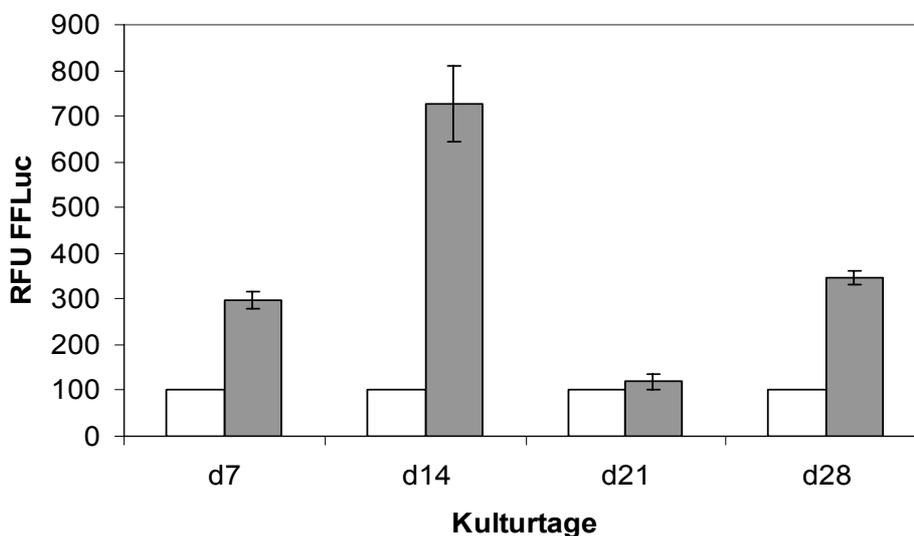
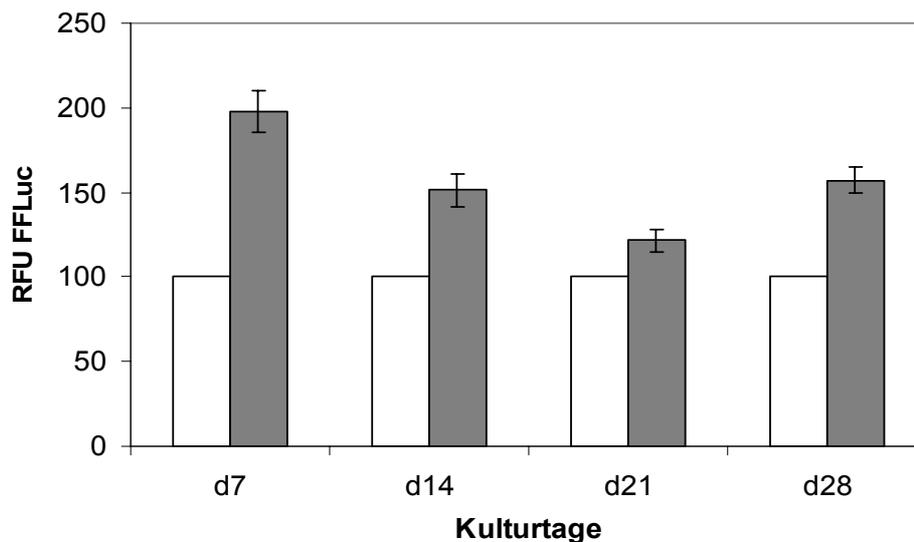


Abbildung 11: Stimulation des PCK1-Promotors in *in vitro* differenzierten rAT-MSCs durch cAMP. Nach 5, 12, 19 und 27 Tagen Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium erfolgte eine transiente Transfektion der Zellen für 24 h mit Plasmiden zur Expression der *Firefly Luciferase* unter Kontrolle des PCK1-Promotors bzw. der *Renilla Luciferase* unter Kontrolle des SV-40 Promotors. Die Aktivität der Luciferase wurde luminometrisch nach weiteren 24 h nach Zugabe (weiße Balken) oder ohne Zugabe (graue Balken) von 50 μ M CPT-cAMP gemessen. Zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen wurde die *Firefly Luciferase* gegen die kotransfizierte *Renilla Luciferase* abgeglichen.

3.1.3 Transplantation und funktionelle Integration von rAT-MSCs in Rattenlebern

Aus dem Peritonealfett von Wildtyp ($CD26^{+/+}$) Fischerratten wurden rAT-MSCs isoliert und kultiviert. Diese rAT-MSCs wurden nach einer 4-tägigen Expansionszeit undifferenziert (nd, n=3) oder nach weiterer 14-tägiger Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium differenziert (d, n=3) und in die Lebern von $CD26^{-/-}$ defizienten ($CD26^{-/-}$) Fischerratten nach einer 1/3 Hepatektomie transplantiert. Anhand der membranständigen Dipeptidylpeptidase IV lassen sich die $CD26^{+/+}$ Zellen mittels enzymatischen Nachweises im negativen Hintergrund der $CD26^{-/-}$ Empfängerleber cytochemisch darstellen. Zudem exprimierten die transplantierten rAT-MSCs GFP unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin- oder des leberspezifischen PCK1-Promotors. Die Transgene waren zwei Tage nach der Isolierung der rAT-MSCs durch lentiviralen Gentransfer in die zu transplantierenden rAT-MSCs eingebracht worden. Die Empfängerlebern wurden 10 Wochen nach der Transplantation entnommen und die Besiedelung der Empfängerleber durch die transplantierten Zellen untersucht. In die Lebern, in die die vordifferenzierten rAT-MSCs eingebracht worden waren, ließen sich große Bereiche $CD26$ -positiver Zellen im Leberparenchym der Empfängertiere erkennen (Abb. 12C, D). In diesen Lebern ließ sich auch die Expression des GFP sowohl unter der Kontrolle des leberspezifischen PCK1-Promotors (Abb. 12G) als auch unter der des konstitutiv aktiven Ubiquitin-Promotors (Abb. 12H) nachweisen. Im Gegensatz dazu waren in den Lebern der Tiere, in die undifferenzierte rAT-MSCs eingebracht worden waren, nur einzelne Zellen oder sehr kleine Bereiche transplantierten Zellen zu identifizieren. Diese deutlich geringere Besiedelung des Leberparenchyms der Empfängertiere durch undifferenzierte

rAT-MSC war sowohl mittels enzymatischem CD26-Nachweis (Abb. 12A, B) als auch anhand des immunhistochemischen Nachweises der transgenen GFP-Expression unter Kontrolle des PCK1- (Abb. 12E) oder Ubiquitin-Promotors (Abb. 12F) nachweisbar. Die PCK1 wird physiologisch vorwiegend in periportalen, nicht aber in perivenösen Hepatozyten exprimiert (5). In dem hier verwendeten Transplantationsmodell der CD26-defizienten Fischerratte integrierten sich die transplantierten Hepatozyten vorwiegend in den periportalen Bereichen der Leberläppchen (119). Entsprechend wurde auch in der vorliegenden Untersuchung GFP unter der Kontrolle des PCK1-Promotors in periportalen Bereichen beobachtet (Abb. 12G), während die GFP-Expression unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors auch in perivenösen Bereichen zu finden war (Abb. 12H). Die Transplantationsversuche zeigten, dass sich rAT-MSC im Leberparenchym der Empfängertiere in topologisch richtiger Orientierung integrieren und am Ort der Integration leberspezifische Eigenschaften aufwiesen.

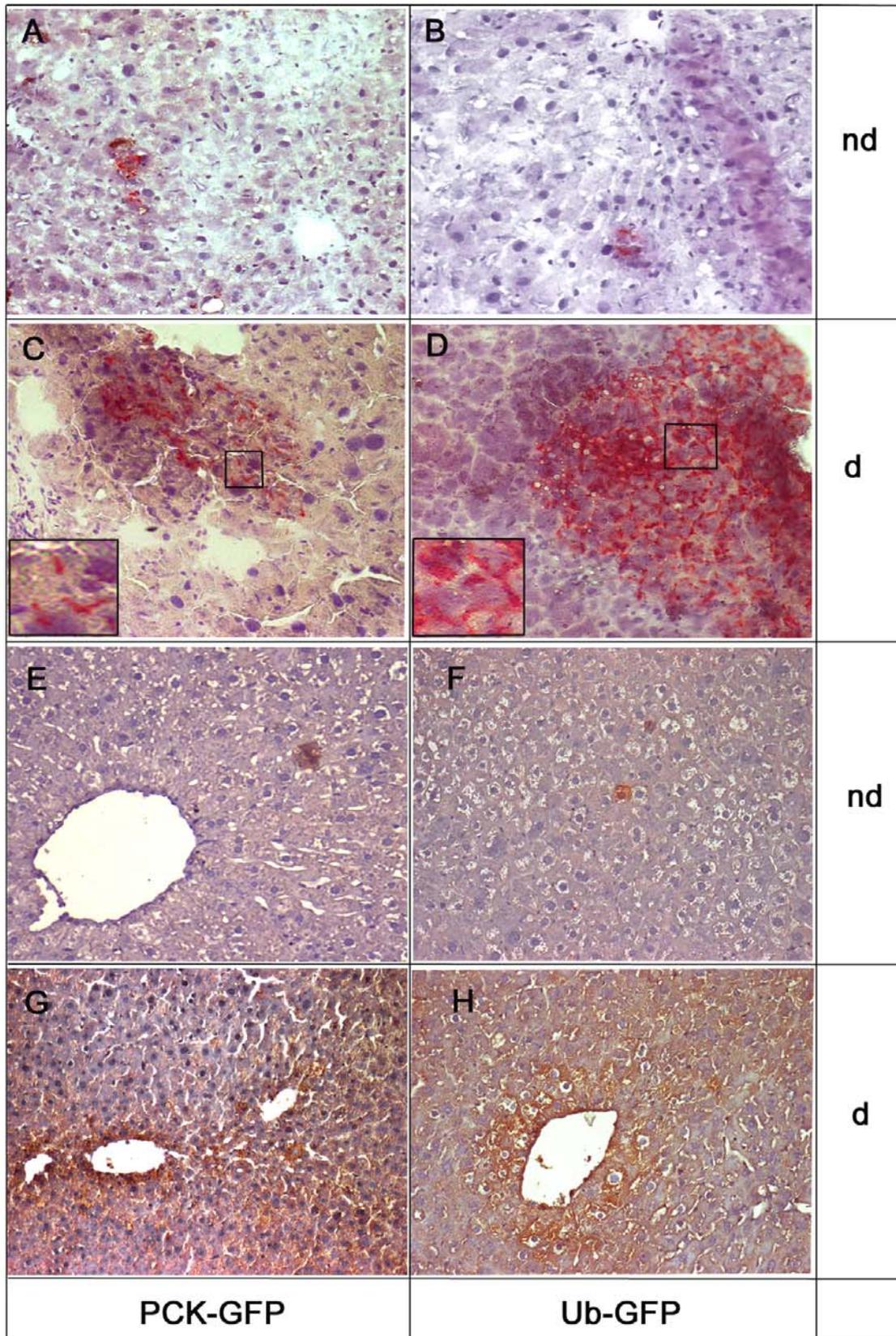


Abbildung 12: Integration von transplantierten undifferenzierten (nd) und *in vitro*-vordifferenzierten (d) rAT-MSC in Empfängerlebern. In rAT-MSC aus Wildtyp Fischerratten wurde das Transgen GFP unter Kontrolle des PCK1- (PCK-GFP) oder des Ubiquitin-

(Ub-GFP) Promotors durch lentiviralen Gentransfer stabil eingebracht. Diese so markierten rAT-MSC wurden über die Portalvene in die Lebern von CD26^{-/-} Fischerratten transplantiert. Nach zehn Wochen wurden die transplantierten Zellen histochemisch auf eine CD26-Expression (A-D) untersucht. Die GFP Expression (E-H) unter dem PCK1- oder Ubiquitin-Promotor wurde immunhistochemisch nachgewiesen (Vergrößerung 100x). Die Ausschnitte in C und D zeigen die typische kanalikulär-membranständige Lokalisation von CD26 in stärkerer Vergrößerung (400x).

3.1.4 Quantifizierung der hepatischen Repopularisierung durch rAT-MSC

In Leberschnitten kann die Repopularisierung einer Empfängerleber durch transplantierte Hepatozyten nur geschätzt werden. Zur Quantifizierung der Repopularisierungsrate durch undifferenzierte oder *in vitro* hepatogenvordifferenzierte rAT-MSC in den Empfängerlebern wurden die Hepatozyten zehn Wochen nach der Transplantation aus den Empfängerlebern isoliert und die Expression von CD26 in der Hepatozytensuspension durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 13). Im Fall der Transplantation von undifferenzierten Zellen lag die Menge der CD26-positiven Spenderzellen mit 0,8 % - 1,1 % deutlich unter der Menge bei Transplantation der *in vitro*-vordifferenzierten Zellen (12,4 % - 17,2 %). Die Repopularisierungsrate war identisch bei der Verwendung von Zellen, die GFP unter der Kontrolle des Ubiquitin- und des PCK1-Promotors exprimierten. Die Ergebnisse aus zwei Experimenten sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

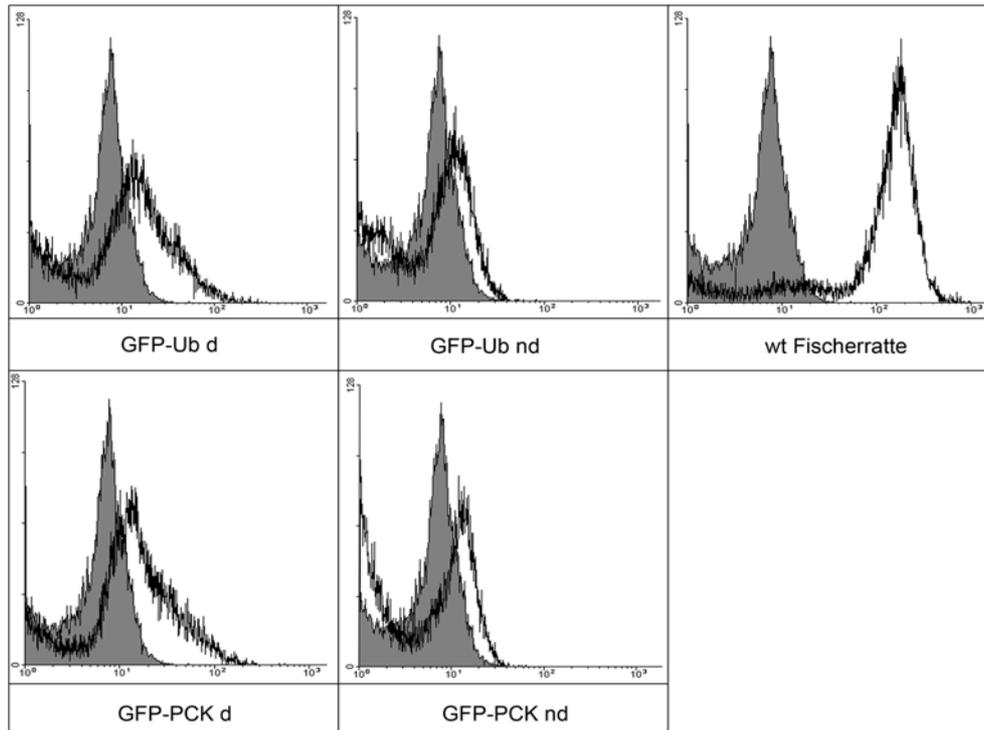


Abbildung 13: FACS-Analyse transplantierte $CD26^{+/+}$ rAT-MSC in Lebern von $CD26^{-/-}$ Empfänger-Fischerratten. In rAT-MSC aus Wildtyp Fischerratten wurde das Transgen GFP unter Kontrolle des PCK1- (PCK-GFP) oder des Ubiquitin- (Ub-GFP) Promotors durch lentiviralen Gentransfer stabil eingebracht. Die Zellen wurden undifferenziert (nd) bzw. nach 14-tägiger hepatogener Differenzierung *in vitro* (d) in die Empfängertiere transplantiert. CD26-positive Spenderzellen wurden zehn Wochen nach Transplantation aus der isolierten Hepatozytenfraktion der Empfängertiere analysiert. Graue Fläche unter der Kurve – IgG Isotypkontrolle, weiße Fläche unter der Kurve – spezifischer Antikörper.

| Promotor | nicht differenziert (V1 / V2) | differenziert (V1 / V2) | wt Kontrolle (V1 / V2) |
|-----------|----------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Ubiquitin | 0,8 % / 1,1 % | 15,6 % / 12,4 % | 83 % / 87 % |
| PCK | 0,8 % / 1,0 % | 14,8 % / 17,2 % | 85 % / 80 % |

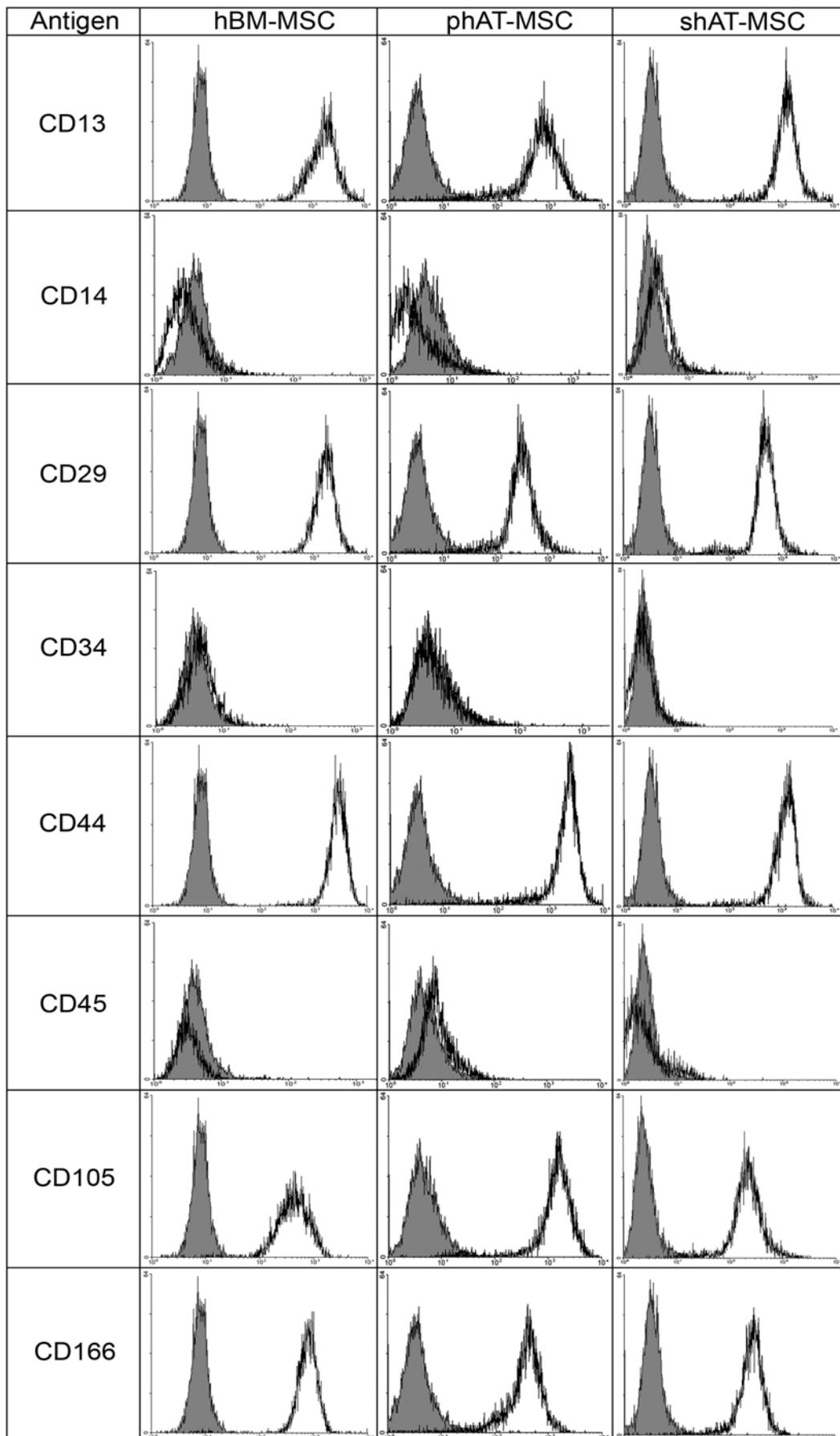
Tabelle 8: Bestimmung der Repopularisierung von $CD26^{-/-}$ Empfängertieren mit $CD26^{+/+}$ rAT-MSC mittels FACS-Analyse. CD26-positive Spenderzellen wurden zehn Wochen nach Transplantation undifferenzierter oder hepatogen-vordifferenzierter rAT-MSC aus der isolierten Hepatozytenfraktion von Empfängertieren analysiert. Als Kontrolle diente eine Hepatozytenfraktion aus Wildtyp $CD26^{+/+}$ Fischerratten (wt). Die Tabelle zeigt den relativen Anteil der Spenderhepatozyten an der Anzahl der Gesamthepatozyten aus zwei unabhängigen Experimenten (V1/V2).

3.2 Leberregeneration mit humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe im xenogenen Mausmodell

3.2.1 Isolierung und Charakterisierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) aus dem Fettgewebe im Vergleich zu hMSC aus dem Knochenmark

In Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin IV der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Dr. Lutz P. Müller) wurde in der Arbeitsgruppe ein Protokoll zur Isolierung von hBM-MSC (*human bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) aus Beckenkammfunktionen des Knochenmarks und deren hepatogene Differenzierung und Transplantation etabliert. Zur Durchführung der experimentellen Arbeiten mit humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) aus Fettgewebe und Knochenmark aus Röhrenknochen mussten zunächst die Protokolle zur Aufreinigung adaptiert und etabliert werden. Knochenmark stammte aus der orthopädischen Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und wurde im Rahmen regulärer Oberschenkeloperationen gewonnen. Fettgewebe stammte aus dem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie und wurde im Rahmen regulärer Operationen gewonnen. Es wurden hMSC aus dem peritonealen (*peritoneal human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*, phAT-MSC) und dem subkutanen Fettgewebe (*subcutaneous human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells*, shAT-MSC) isoliert und analysiert. Nach der Isolierung und anschließender Expansion wurde das Expressionsmuster von Oberflächenantigenen auf den Zellen mittels FACS-Analyse untersucht. Die isolierten hMSC aus den verschiedenen Geweben zeigten das gleiche, für hMSC typische Expressionsprofil von Oberflächenantigenen (Abb. 14A). Keine der drei Populationen zeigte die Expression hämatopoetischer Marker wie CD14, CD34 und CD45 (48, 62, 120). Das Fehlen von CD14, CD34 und CD45 und die Expression der Antigene CD13, CD29, CD44, CD105 und CD166 gelten als typisch für MSC aus dem Knochenmark oder dem Fettgewebe (52, 56). Die phAT-MSC und shAT-MSC zeigten im Vergleich zu den hBM-MSC Subpopulationen, die sich jeweils von den Hauptpopulationen abzeichneten. Weitergehende FACS-Analysen zeigten jedoch, dass diese Subpopulationen während einer 10-tägigen Kultivierung im Stammzell-erhaltungsmedium EM6F verschwanden (Abb. 14 B).

A



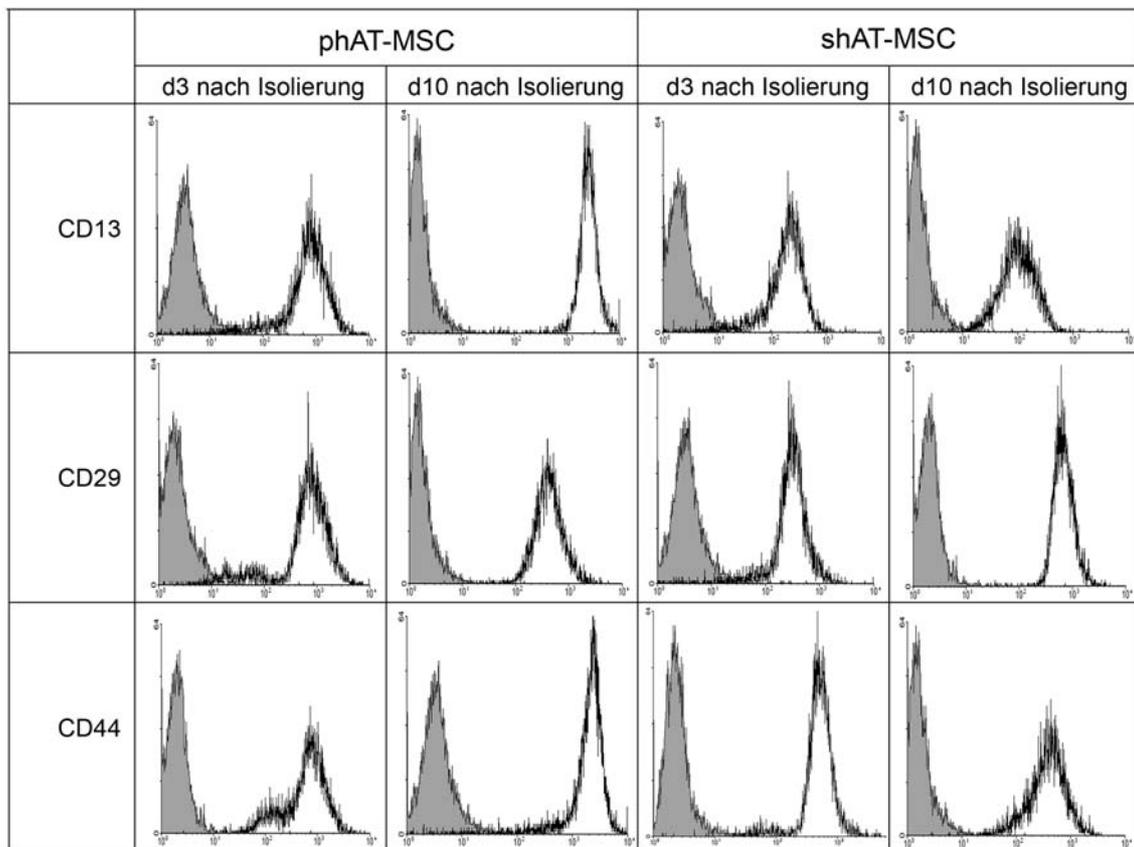
B

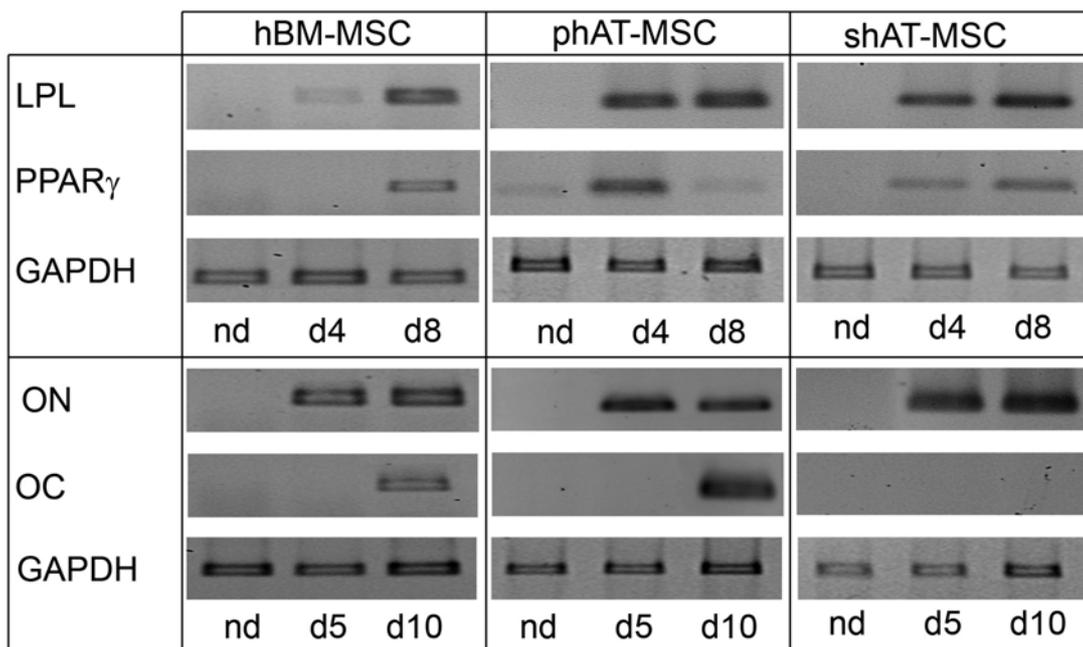
Abbildung 14: Expression von Oberflächenantigenen auf hMSC. (A) Vergleich zwischen hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC. Isolierte Zellen wurden mit FITC- oder PE-konjugierten Antikörpern gegen das entsprechende Antigen inkubiert und mittels FACS Analyse untersucht. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Analyse von 6 (hBM-MSC), 20 (phAT-MSC) bzw. 22 (shAT-MSC) unabhängigen Experimenten. (B) FACS-Analyse von phAT-MSC und shAT-MSC nach 3- und 10-tägiger Expansion in Stammzellerhaltungsmedium. Die Subpopulationen, die 3 Tage nach der Isolierung zu erkennen waren, verschwanden im Zuge der Expansion. Es sind drei Beispiele der zu beobachtenden Subpopulationen (CD13, CD29 und CD44) gezeigt. Die grau unterlegten Kurven repräsentieren die IgG-Isotyp Kontrollen, die weißen Flächen die Expression der jeweiligen Antigene. Es wurden jeweils 10.000 Zellen/Antigen analysiert.

3.2.2. Plastizität der hMSC aus verschiedenen Gewebetypen

Neben der Fähigkeit zur Plastikadhärenz und der CFU ist die Plastizität eine Eigenschaft mesenchymaler Stammzellen und dient als Definitionskriterium (121). Zum Nachweis der Plastizität wurde die Fähigkeit von hBM-MSC, phAT-MSC und

shAT-MSC zur adipogenen und osteogenen Differenzierung untersucht. Die adipogene Differenzierung wurde zum einen morphologisch mit der Sudan III-Färbung zum Nachweis intrazellulärer Lipideinlagerungen und zum anderen mittels semiquantitativer RT-PCR zum Nachweis von den für Adipozyten spezifischen Transkripten Lipoprotein Lipase (LPL) und *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) untersucht. Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurden extrazelluläre Calciumphosphat-Präzipitate mit Alizarin-Rot und die Expression der mRNA von Osteonectin (ON) und Osteocalcin (OC) durch semiquantitative RT-PCR untersucht. Die hMSC aus den verschiedenen Geweben exprimierten nach Kultivierung in adipogenem bzw. osteogenem Differenzierungsmedium für Adipozyten bzw. Osteoblasten typische Transkripte (Abb. 15A) und bildeten Lipideinlagerungen bzw. extrazelluläre Calciumphosphatablagerungen (Abb. 15B). Allerdings waren graduelle Unterschiede zu erkennen. Zum Beispiel wiesen osteogen differenzierte shAT-MSC keine OC-Transkripte auf, hBM-MSC exprimierten PPAR γ erst zu späteren, hAT-MSC jedoch bereits zu früheren Kulturzeitpunkten (Abb. 15A). Im Vergleich zu hAT-MSC waren hBM-MSC tendenziell besser zur Bildung von Calciumphosphatablagerungen, umgekehrt hAT-MSC besser zur Bildung von Lipideinlagerungen befähigt (Abb. 15B). Allerdings wiesen die verschiedenen Stammzellpopulationen die Fähigkeit zur multiplen Differenzierung auf, womit ihre Plastizität nachgewiesen werden konnte.

A



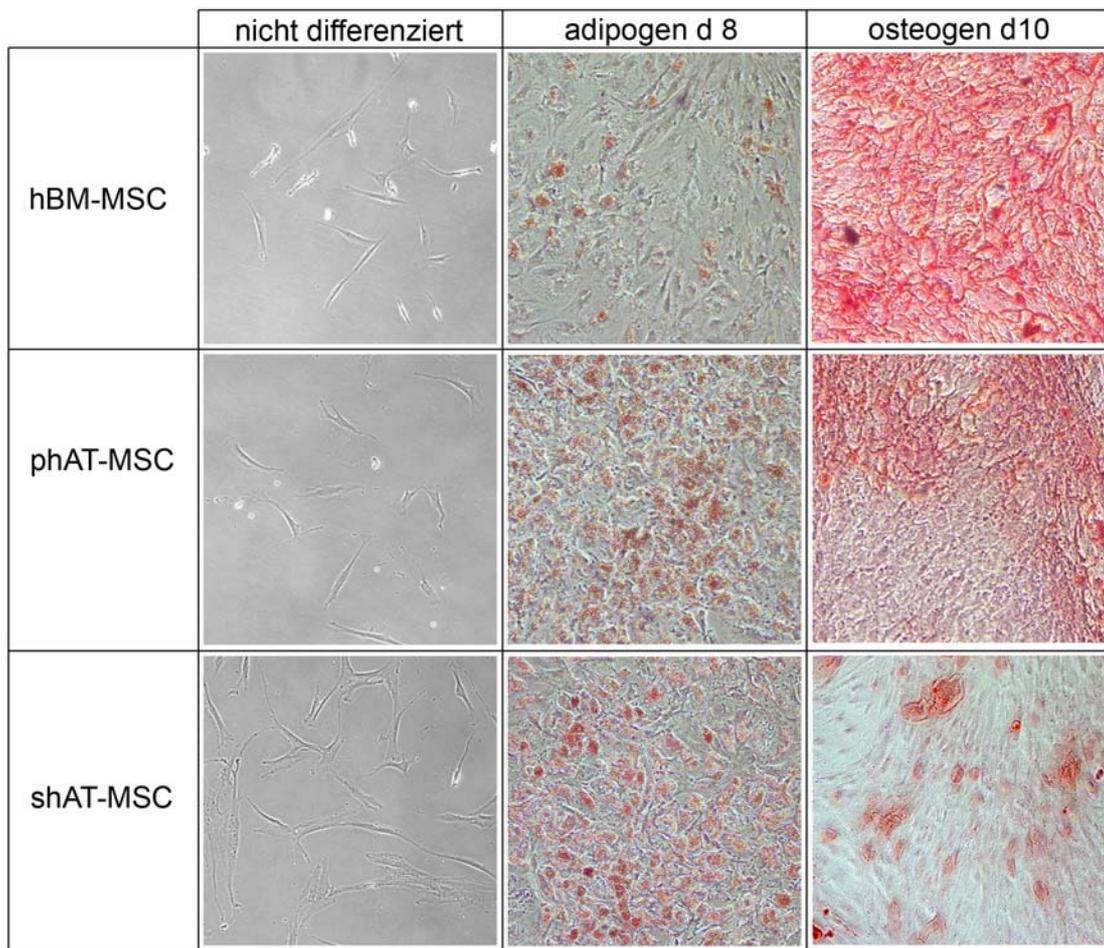
B

Abbildung 15: Nachweis der Plastizität der hMSC aus Knochenmark und Fettgewebe. (A) Darstellung der Expression von LPL- und PPAR γ -Transkripten während der adipogenen Differenzierung und der Expression von ON- und OC-Transkripten während der osteogenen Differenzierung mittels semiquantitativer RT-PCR. (B) Nachweis morphologischer Veränderungen der hMSC während der adipogenen bzw. der osteogenen Differenzierungen. Indikation intrazellulärer Lipideinlagerungen mittels Sudan III-Färbung, Indikation extrazellulärer Calciumphosphat-Präzipitate mittels Alizarin-Rot-Färbung (Vergrößerung 100x).

3.2.3 Hepatogene Differenzierung von hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC

Das Potential der hMSC aus den verschiedenen Geweben zur hepatogenen Differenzierung wurde zunächst *in vitro* untersucht. Die Zellen wurden in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten

wurde Gesamt-RNA isoliert und die Expression von Markern hepatozytärer Vorläuferzellen und adulter Hepatozyten semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt. In undifferenzierten hBM-MSC waren Vorläufermarker wie α -Fetoprotein (AFP), die Cytokeratine 7 und 19 (CK7, CK19), Connexin 43 (CX43) bereits exprimiert. Die Expression nahm während des Kulturverlaufs ab und war nach 21 Tagen nicht mehr nachweisbar. Dagegen waren diese Marker in den phAT-MSC und shAT-MSC zu späteren Kulturzeitpunkten noch nachweisbar. Nur die CK19-Expression war in den shAT-MSC am Tag 21 nicht nachweisbar. Während die AFP-Expression in den shAT-MSC nicht mehr nachweisbar war, war sie bei den phAT-MSC nach 21 Tagen im Differenzierungsmedium noch deutlich nachweisbar. Die Expression hepatozytärer Marker nahm im Verlauf der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium generell zu. In undifferenzierten hBM-MSC waren Transkripte leberspezifischer Gene kaum oder nur sehr schwach zu sehen. Im Gegensatz dazu zeigten die hMSC aus dem Fettgewebe schon im nicht differenzierten Zustand eine teilweise starke Expression von leberspezifischen Genen. Insbesondere in undifferenzierten phAT-MSC war die mRNA der Carbamoylphosphatsynthetase (CPS) und des epithelialen Markers Cytokeratin 18 (CK18) stark exprimiert. Andere leberspezifische Marker wie der Cytochrom P450 Subtyp 3A4 (CYP3A4), die Dipeptidylpeptidase IV (CD26), Albumin, die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase 1 (PCK1) und das *Gap Junction* Protein Connexin 32 (CX32) waren in undifferenzierten hAT-MSC gar nicht oder nur schwach exprimiert. Ihre Expression nahm im Verlauf der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium zu (Abb. 16A). Während der Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium wiesen die verschiedenen MSC (hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC) deutliche Unterschiede in den Proliferationseigenschaften auf. Die Zellzahl der hBM-MSC verdoppelte sich innerhalb von 21 Tagen in der Kultur, die der shAT-MSC und der phAT-MSC stieg um das 5- bzw. 14-fache an (Abb. 16B).

A

| Marker | phAT-MSC | | | | shAT-MSC | | | | hBM-MSC | | | |
|---------|----------|----|-----|-----|----------|----|-----|-----|---------|----|-----|-----|
| AFP | | | | | | | | | | | | |
| CK19 | | | | | | | | | | | | |
| CK7 | | | | | | | | | | | | |
| CX43 | | | | | | | | | | | | |
| CYP3A4 | | | | | | | | | | | | |
| PCK1 | | | | | | | | | | | | |
| CPS | | | | | | | | | | | | |
| CK18 | | | | | | | | | | | | |
| CX32 | | | | | | | | | | | | |
| CD26 | | | | | | | | | | | | |
| Albumin | | | | | | | | | | | | |
| TFN | | | | | | | | | | | | |
| GAPDH | | | | | | | | | | | | |
| | nd | d7 | d14 | d21 | nd | d7 | d14 | d21 | nd | d7 | d14 | d21 |

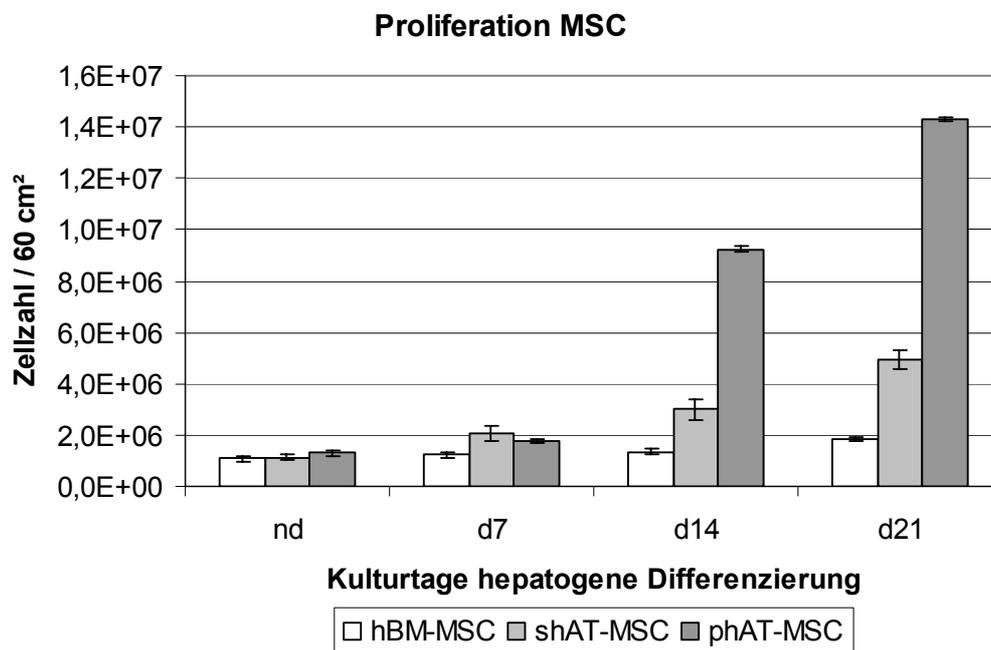
B

Abbildung 16: Genexpressionsmuster und Proliferation von phAT-MSC, shAT-MSC und hBM-MSC. (A) Expressionsanalyse von hepatozytären Vorläuferzellmarkern und Markern differenzierter Hepatozyten mittels semiquantitativer RT-PCR in undifferenzierten (nd) und hepatogen differenzierten (d) hMSC zu den angegebenen Kulturzeitpunkten. Die konstitutiv exprimierte GAPDH diente als interner Standard. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten. (B) Proliferation der verschiedenen MSC (hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC) während der Kultivierung in hepatogenem Differenzierungsmedium. Die Zellen wurden auf einer Wachstumsfläche von 60 cm² kultiviert und die Zellzahl zu den angegebenen Zeitpunkten ermittelt (n = 6).

3.2.4 Funktionalität von hepatogen *in vitro* differenzierten hMSC

Typische hepatozytäre Funktionen sind die Speicherung von Glykogen und die Ammoniakentgiftung über den Harnstoffzyklus. Während der Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium konnte nach 21 Tagen in den differenzierten MSC eine vermehrte Einlagerung von Glykogen beobachtet werden. Diese war bei den phAT-MSC und shAT-MSC ausgeprägter als bei den hBM-MSC. Die Harnstoffsyntheserate nahm mit Beginn der hepatogenen Differenzierung im Vergleich zu undifferenzierten Zellen stark zu. Während die Harnstoffsynthese in hBM-MSC über den Kulturverlauf bis zu einem Maximum am Tag 14 zunahm, hatte diese in phAT-MSC und shAT-MSC bereits am Tag 3 bzw. 7 der Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium ein Maximum erreicht. Anschließend sank die Syntheserate wieder ab. Die gemessene Harnstoffsyntheserate lag im hBM-MSC-Überstand doppelt und shAT-MSC-Überstand viermal so hoch wie die im Überstand von den phAT-MSC gemessene Harnstoffsyntheserate (Abb. 17).

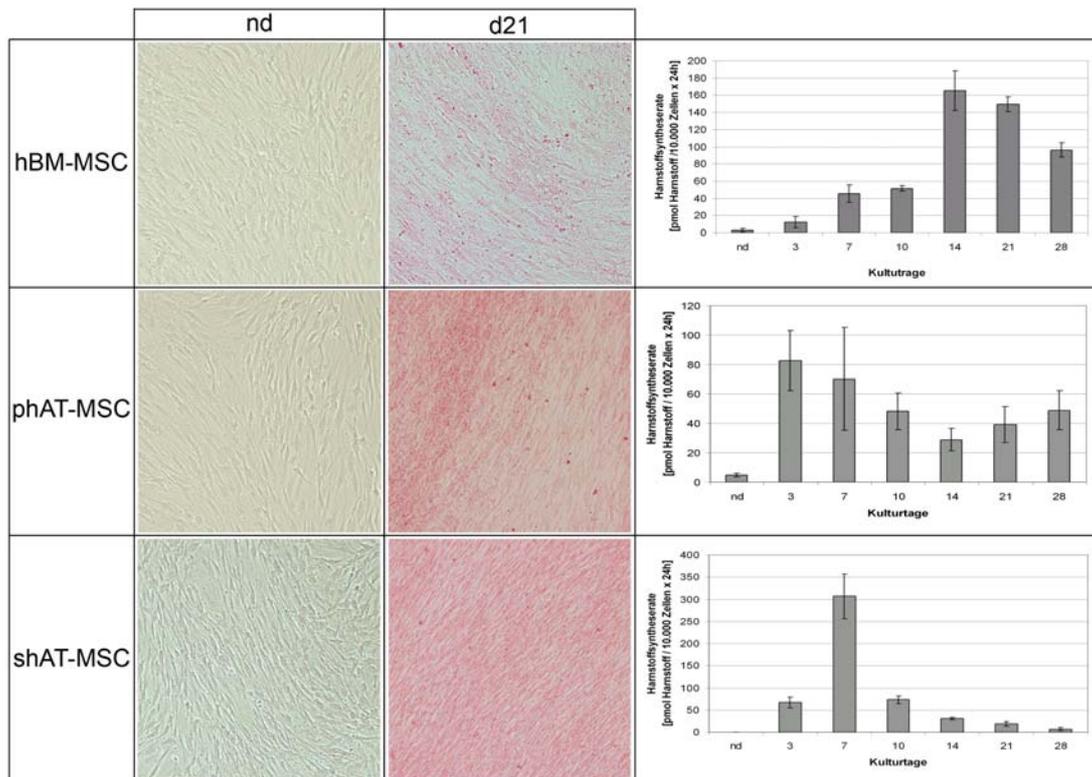
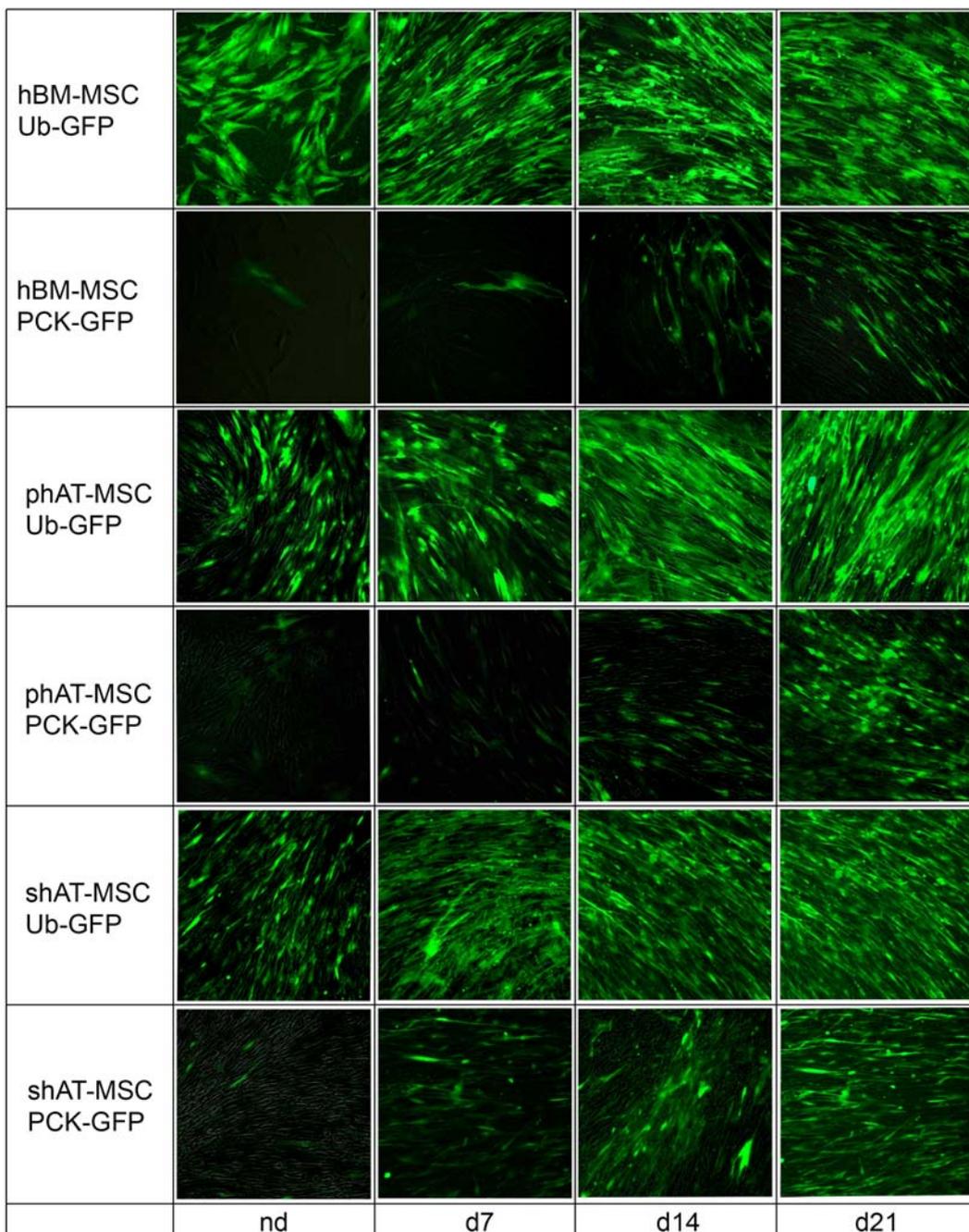


Abbildung 17: Glykogenspeicherung und Harnstoffsynthese in hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC während der hepatogenen Differenzierung. In den für 21 Tage hepatogen differenzierten hMSC wurde die Glykogeneinlagerung mittels PAS-Färbung nachgewiesen (Vergrößerung 100x). Der jeweils nach 24 h gebildete Harnstoff wurde im Kulturüberstand zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten.

Ein weiterer funktioneller Nachweis der hepatogenen Differenzierung ist die Aktivierung des hepatozytenspezifischen Promotors der PCK1 mit zunehmender Differenzierung der hMSC. Hierfür wurde in die Zellen GFP als Reportergen unter der Kontrolle des PCK1-Genpromotorfragments -457/+65 und unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors durch lentivirale Infektion eingebracht. Fluoreszenzmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass die Expression des GFP unter Kontrolle des PCK1-Genpromotors über einen 21-tägigen Kulturverlauf in hepatogenem Differenzierungsmedium stetig zunahm. Die des GFP unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors zeigte sich hingegen über den Kulturverlauf konstant. Die Aufnahmen zeigen eine gleichmäßig intensive Verteilung des GFP unter Kontrolle des Ubiquitinpromotors in allen Zellen während der hepatogenen Differenzierung. Die Expression des GFP unter Kontrolle des PCK1-Promotorfragmentes nahm zwar in allen hMSC während der hepatogenen Differenzierung zu, war jedoch am stärksten

in den Zellen, die in Bereichen hoher Konfluenz zu finden waren (Abb. 18A). Der Nachweis des GFP in der *Western Blot*-Analyse bestätigte die Expressionszunahme unter PCK1-Promotorkontrolle während der hepatogenen Differenzierung. Die GFP-Expression unter Kontrolle des Ubiquitinpromotors blieb während des Kulturverlaufes konstant (Abb. 18B). Vinculin diente als Ladungskontrolle. Zwischen den MSC aus den unterschiedlichen Geweben waren keine Unterschiede in der Aktivierung der beiden Promotoren festzustellen. Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die MSC aus unterschiedlichen Geweben durch Kultivierung in hepatogenem Differenzierungsmedium Eigenschaften differenzierter Hepatozyten annehmen.

A



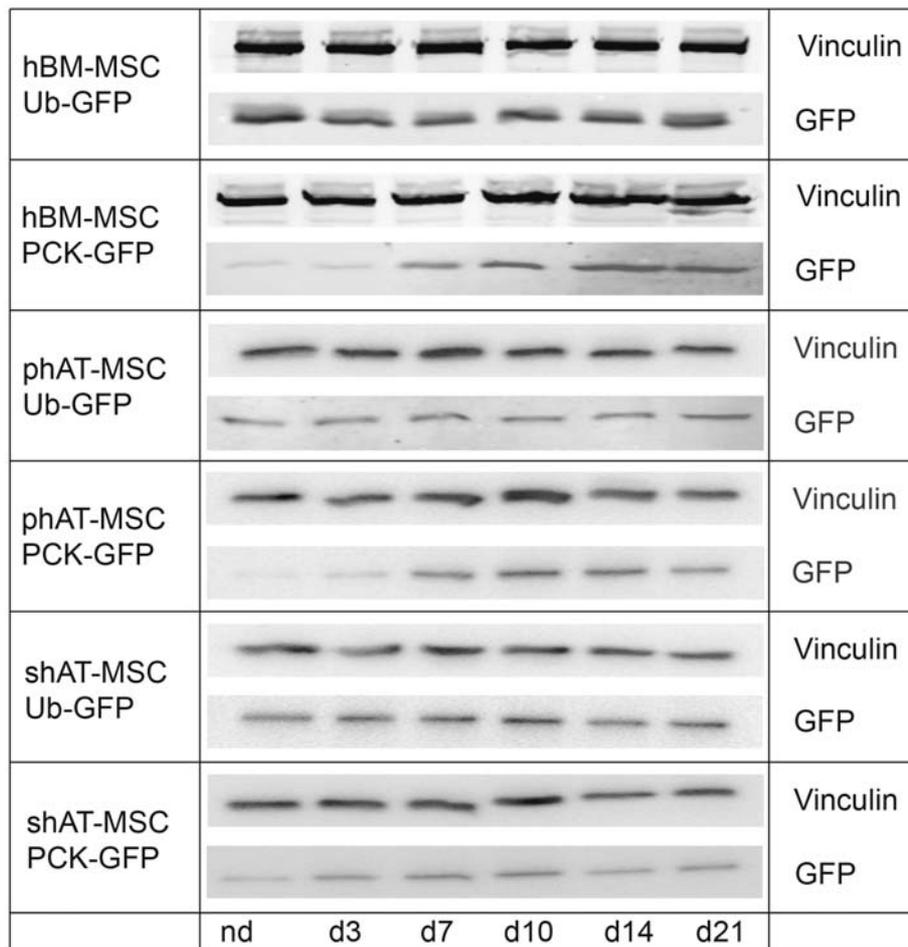
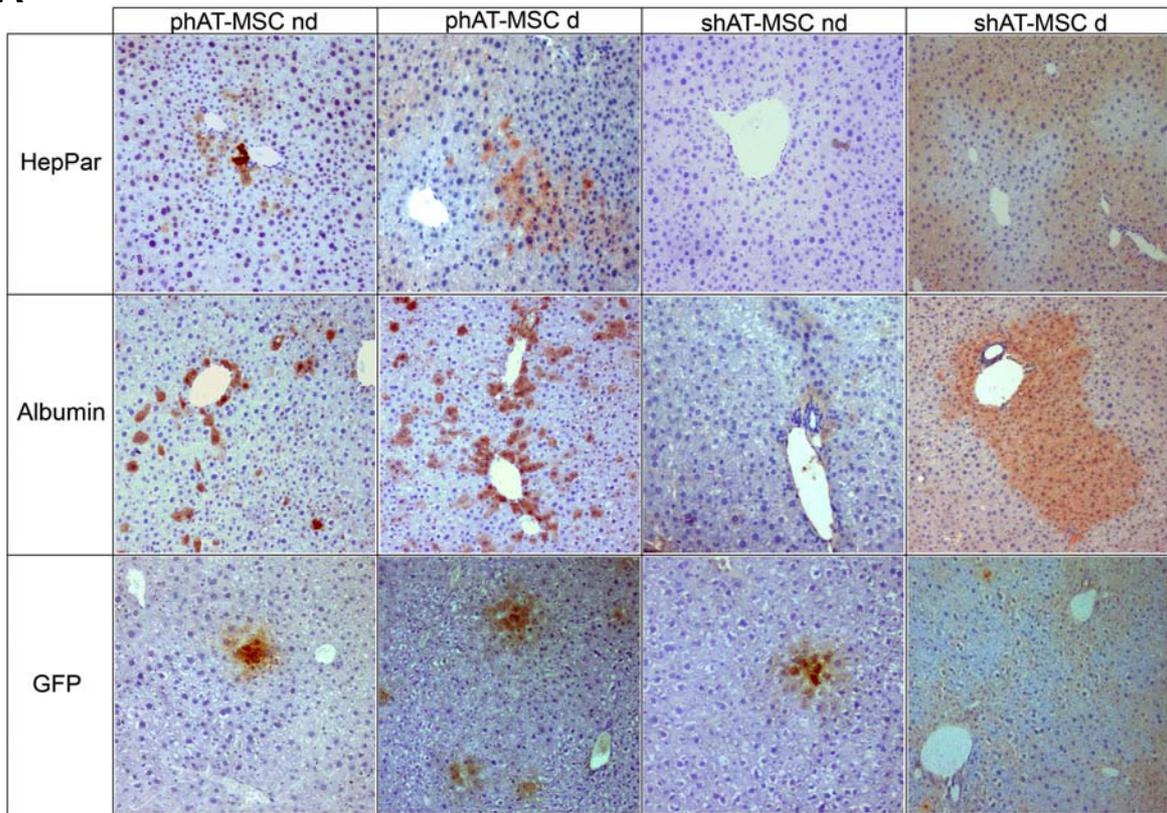
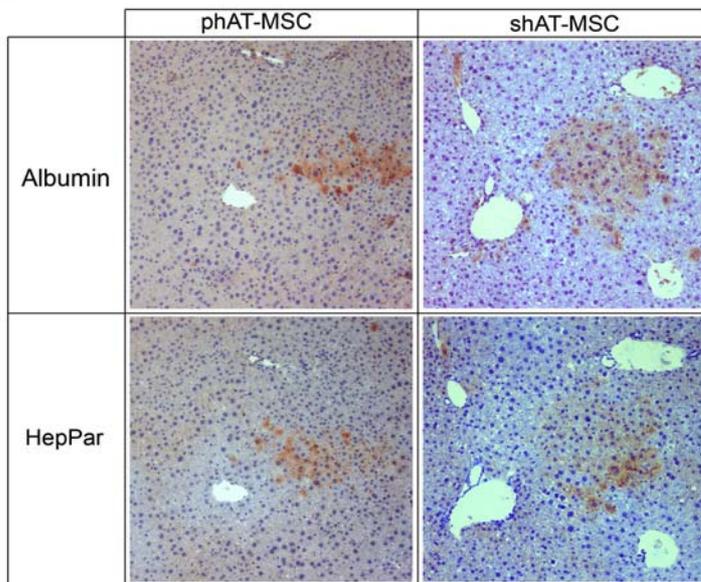
B

Abbildung 18A: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der GFP-Expression während der hepatogenen Differenzierung von hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC. Nach lentviraler Infektion der hMSC mit dem Transgen GFP unter der Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors (Ub-GFP) bzw. des PCK1-Promotors (PCK-GFP) wurden die Zellen entweder undifferenziert belassen (nd) oder in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert (d). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die GFP-Expression jeweils fluoreszenzmikroskopisch analysiert (Vergrößerung 100x).

Abbildung 18B: *Western Blot*-Analyse der GFP-Expression in hBM-MSC, phAT-MSC und shAT-MSC während der hepatogenen Differenzierung. Nach lentviraler Infektion der hMSC mit dem Transgen GFP unter der Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors (Ub-GFP) bzw. des PCK1-Promotors (PCK-GFP) wurden die Zellen entweder undifferenziert belassen (nd) oder in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert (d). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die GFP-Expression mittels *Western Blot*-Verfahren analysiert. Vinculin diente als Ladungskontrolle (25 µg Gesamtprotein/Fraktion).

3.2.5 Transplantation von hMSC aus dem Fettgewebe im xenogenen Mausmodell

Die *in vitro* Untersuchungen hatten gezeigt, dass hMSC aus dem Fettgewebe wie die hBM-MSC zur hepatozytären Differenzierung befähigt sind. Es sollte weiter untersucht werden, ob die phAT-MSC und shAT-MSC in der Lage sind, sich in das Parenchym einer Empfängerleber nach partieller Hepatektomie zu integrieren und die Empfängerleber zu repopularisieren. Um die zu erwartende Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, wurden die humanen Zellen in die Lebern immundefizienter Pfp/Rag2^{-/-}-Mäuse nach erfolgter 1/3 Hepatektomie transplantiert. Es wurden sowohl undifferenzierte (nd) als auch phAT-MSC und shAT-MSC, die 14 Tage in hepatogenem Differenzierungsmedium vordifferenziert worden waren (d), im Versuch eingesetzt. Die Transplantation der phAT-MSC und shAT-MSC erfolgte jeweils in zwei Tiere, wobei die hMSC das Transgen GFP nach lentiviralem Gentransfer unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors exprimierten. Die transplantierten Spenderzellen konnten immunhistochemisch anhand der GFP-Expression vorwiegend in den periportalen Bereichen der Empfängerleber nachgewiesen werden. Mit für die humanen Proteine spezifischen Antikörpern konnte immunhistochemisch gezeigt werden, dass die transplantierten hAT-MSC humanes Albumin und das humane, mitochondriale Antigen HepPar1 exprimierten. Während die shAT-MSC große, zusammenhängende Zellverbände im Empfängerparenchym bildeten (Abb. 19, rechte Balken), zeigten die phAT-MSC ein mehr zerstreutes Muster der Integration im Empfängerparenchym (Abb. 19, linke Balken). Anhand von Serienschnitten konnte gezeigt werden, dass die beiden humanen Proteine Albumin und HepPar1 in den identischen transplantierten Spender-hAT-MSC exprimiert wurden (Abb. 19B). Im Vergleich zur Transplantation der hepatogen vordifferenzierten hAT-MSC bildeten die nicht differenzierten hAT-MSC nur kleine Cluster oder integrierten sich als einzelne Zellen im Empfängerparenchym. Dennoch exprimierten auch sie humanes Albumin und HepPar1, zwei spezifische Marker, die die hepatozytäre Funktionalität der humanen Spenderzellen anzeigen. Die Integration erfolgte, ähnlich wie bei den vordifferenzierten hAT-MSC, vorwiegend in den periportalen Bereichen. Die Spezifität der verwendeten Antikörper für die immunhistochemische Darstellung humaner Proteine in der Mausleber ist in Abb. 19C gezeigt.

A**B**

C

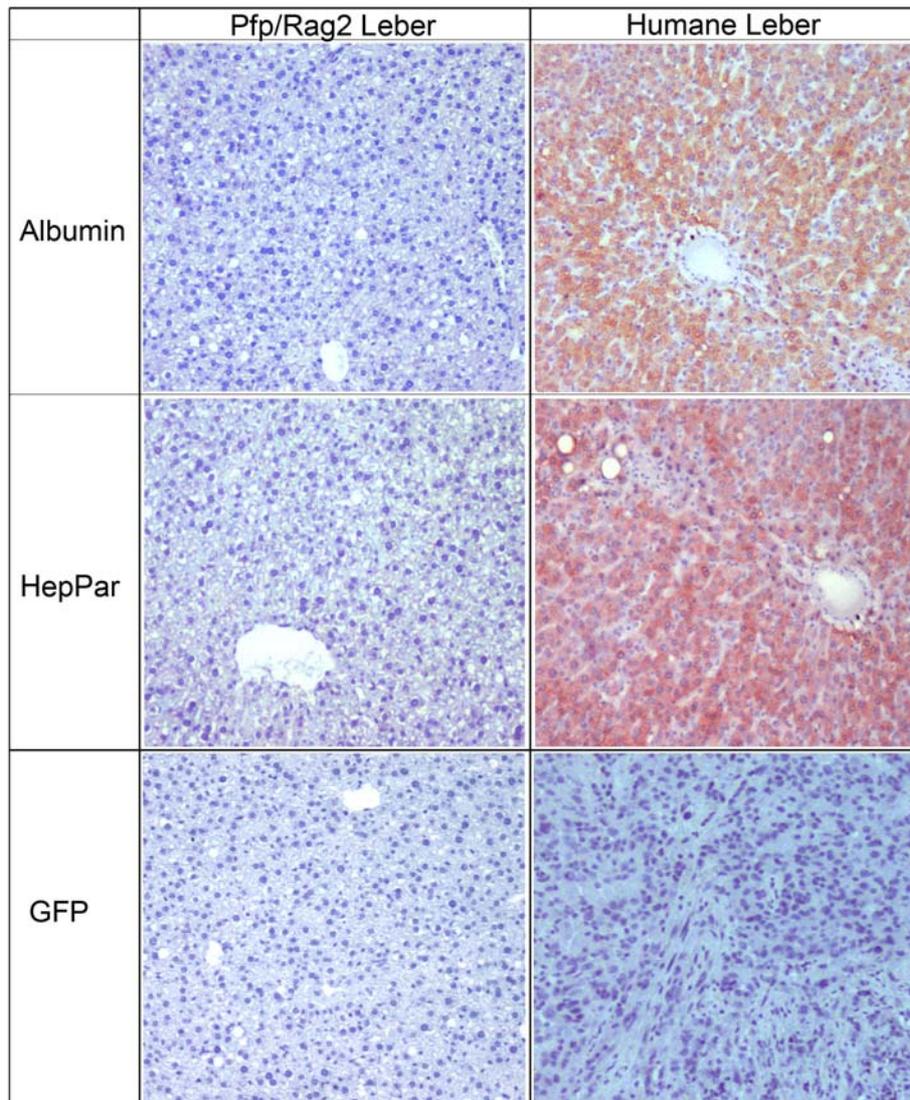


Abbildung 19: Immunhistochemische Darstellung der Integration nicht differenzierter (nd) und 14 Tage hepatogen vordifferenzierter phAT-MSC und shAT-MSC (d) im Leberparenchym von immundefizienten Empfängermäusen. (A) Während transplantierte phAT-MSC ein zerstreutes Integrationsmuster mit einzeln liegenden Zellen oder kleinen Bereichen zeigen, integrieren sich die shAT-MSC in zusammenhängenden Zellverbänden. Die Menge der integrierten Zellen ist bei Verwendung hepatogen vordifferenzierter hAT-MSC deutlich höher als bei Verwendung undifferenzierter hAT-MSC. Die Expression des GFP beweist die humane Herkunft der integrierten Spenderzellen, die des humanen Albumins und des leberspezifischen HepPar1 zeigt den hepatozytären Charakter der transplantierten hAT-MSC. (B) Die Kolo-kalisation der Expression von Albumin und HepPar1 im Serienschritt in denselben Zellen zeigt die hepatozytäre Funktionalität der transplantierten hAT-MSC (Vergrößerung 100x). (C) Die verwendeten Antikörper weisen spezifisch humanes Albumin und humanes HepPar1, nicht aber die murinen Proteine nach (Vergrößerung 100 x).

Albumin ist das dominierende Plasmaprotein, das von Hepatozyten synthetisiert und in das Blut sezerniert wird. Der Nachweis der Synthese wurde in den hepatozytär differenzierten hAT-MSC immunhistochemisch erbracht (Abb. 19). Zum Nachweis der Sekretion sollte humanes Albumin im Blut der transplantierten Mäuse bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde den Tieren bei der Leberentnahme über die untere Hohlvene Blut entnommen und Albumin mit einem für das humane Protein spezifischen ELISA quantifiziert. Die Menge des humanen Albumins im Mausserum war in den Tieren, die hepatogen vordifferenzierte Spender-hAT-MSC erhielten, deutlich erhöht. Während vordifferenzierte phAT-MSC 140 ± 20 ng/ml und vordifferenzierte shAT-MSC 150 ± 25 ng/ml humanes Albumin ins Blut der Empfängermaus sezernierten, lag die Konzentration im Serum mit nicht differenzierten phAT-MSC und shAT-MSC transplantierten Mäusen bei 2 ± 1 ng/ml und bei 25 ± 5 ng/ml humanen Albumin (Abb. 20). Diese Daten zeigen, dass die *in vitro* hepatogen differenzierten hAT-MSC nach Transplantation in eine Empfängerleber spezifische hepatozytäre Funktionen wie z.B. die Synthese und Sekretion von Plasmaproteinen ausführen.

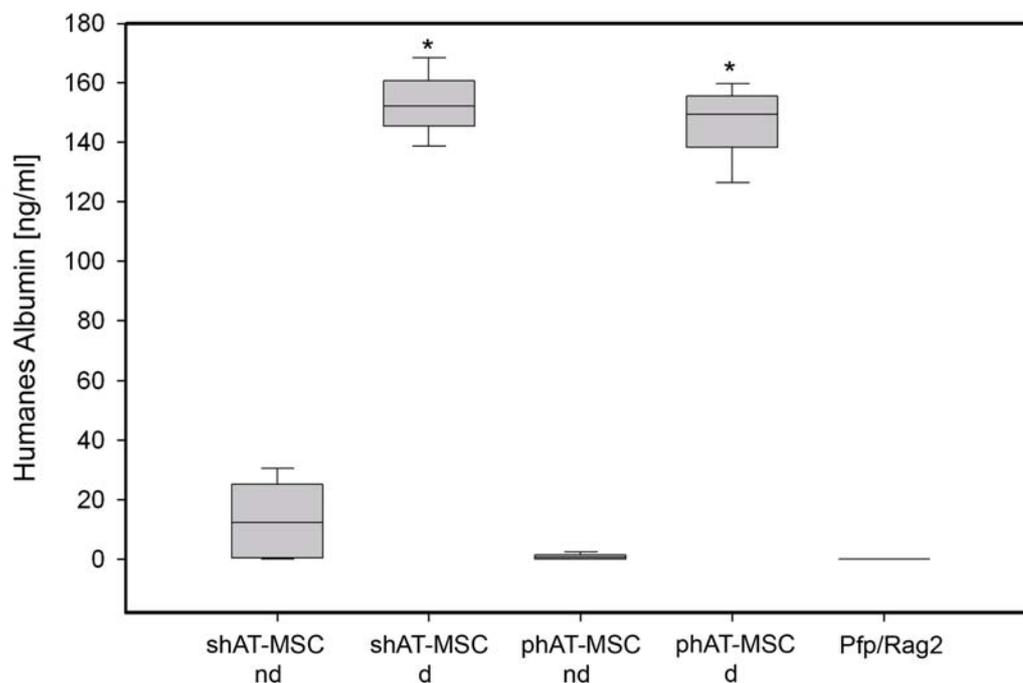


Abbildung 20: Humanes Albumin im Serum mit hAT-MSC transplantierten Mäusen. Zehn Wochen nach Transplantation ist die Konzentration des humanen Albumins im Serum von Mäusen, die hepatogen vordifferenzierte phAT-MSC und shAT-MSC (d) erhielten, signifikant ($p \leq 0,01$) höher als bei Verwendung undifferenzierter phAT-MSC und shAT-MSC (nd). Die Werte sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten.

3.2.6 Quantifizierung der hepatischen Repopularisierung durch differenzierte und undifferenzierte hAT-MSC

Zur Quantifizierung der Repopularisierung der Maus-Empfängerlebern durch transplantierte, hepatogen vordifferenzierte hAT-MSC im Vergleich zu undifferenzierten hAT-MSC, wurden die Hepatozyten aus den Mauslebern isoliert und humane Zellen unter Verwendung anti-humaner Antikörper mittels Durchflußzytometrie analysiert. Als Referenz wurden humane Hepatozyten verwendet. Da das CD29-Molekül sowohl auf humanen Hepatozyten als auch auf undifferenzierten und hepatogen differenzierten hAT-MSC exprimiert wird, kann ein humanspezifischer anti-CD29 Antikörper zur Identifikation von Zellen humanen Ursprungs in den transplantierten Mauslebern genutzt werden. Unter den aus den Mauslebern isolierten Hepatozyten war ein prozentualer Anteil humaner, CD29-positiver Zellen von 12 % bei Transplantation hepatogen vordifferenzierter phAT-MSC und von 26 % bei Transplantation von shAT-MSC gemessen an der Gesamtzellzahl enthalten. Im Vergleich dazu betrug der prozentuale Anteil bei Transplantation der undifferenzierten hAT-MSC 1,2 % (phAT-MSC) und 1,7 % (shAT-MSC). Die Verwendung von vordifferenzierten hAT-MSC für die Transplantation führte also zu einem 10- bzw. 15-mal höheren prozentualen Anteil von humanen Zellen in der Empfängerleber gegenüber der Verwendung undifferenzierter hAT-MSC (Abb 22). Die Analyse wurde mit der gleichen Hepatozytenpopulation unter Verwendung eines humanspezifischen anti-CD26 Antikörpers wiederholt. Der prozentuale Anteil humaner CD26-positiver Zellen an der gesamten Zellpopulation betrug bei Transplantation von hepatogen vordifferenzierten phAT-MSC 4 % und 21 % bei Transplantation von shAT-MSC. Im Vergleich dazu betrug der Anteil 0,3 % (phAT-MSC) und 1,4 % (shAT-MSC) bei Verwendung jeweils undifferenzierter hAT-MSC (Abb. 22B). Dies zeigt, dass die Verwendung von vordifferenzierten hAT-MSC im Vergleich zu undifferenzierten hAT-MSC 13-15-fach effizienter für die Repopularisierung der Leber war (Tab. 9). Zwar handelt es sich bei den Oberflächenmarkern CD29 und CD26 nicht um leberspezifische Marker, doch lassen sich die Zellen humanen Ursprungs auf diese Weise spezifisch in einer Hepatozytenpräparation aus der Mausleber nachweisen.

Humane Hepatozyten exprimierten CD13, CD29 nicht aber CD44. Die Expression von CD105 und CD166 war auf einer Subpopulation humaner Hepatozyten zu erkennen (Abb. 21, rechte Spalte). Die shAT-MSC und phAT-MSC exprimierten zehn

Wochen nach Transplantation weder CD13 noch CD44. Ähnlich wie bei humanen Hepatozyten exprimierten sowohl die phAT-MSC als auch die shAT-MSC CD105 auf einer Subpopulation. Die Expression von CD166 war nur auf den shAT-MSC, nicht aber auf den phAT-MSC nachweisbar. Die Expression von CD29 war wie bei humanen Hepatozyten auf beiden hAT-MSC-Populationen nachweisbar (Abb. 21, linke und mittlere Spalte). Das Experiment wurde zweimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt, die in Tabelle 9 zusammengefasst sind. Damit war das Profil der Oberflächenantigenexpression auf humanen Zellen, die aus den mit diesen Zellen transplantierten Mauslebern isoliert worden waren, ähnlich dem humaner Hepatozyten und unterschied sich deutlich vom Profil undifferenzierter hAT-MSC (vergl. Abb. 14). Alle in den unterschiedlichen Analysen verwendeten human-spezifischen Antikörper ergaben eine deutlich höhere Repopularisierungsrate der Mausempfängerlebern durch hepatogen vordifferenzierte hAT-MSC im Vergleich zu den undifferenzierten hAT-MSC.

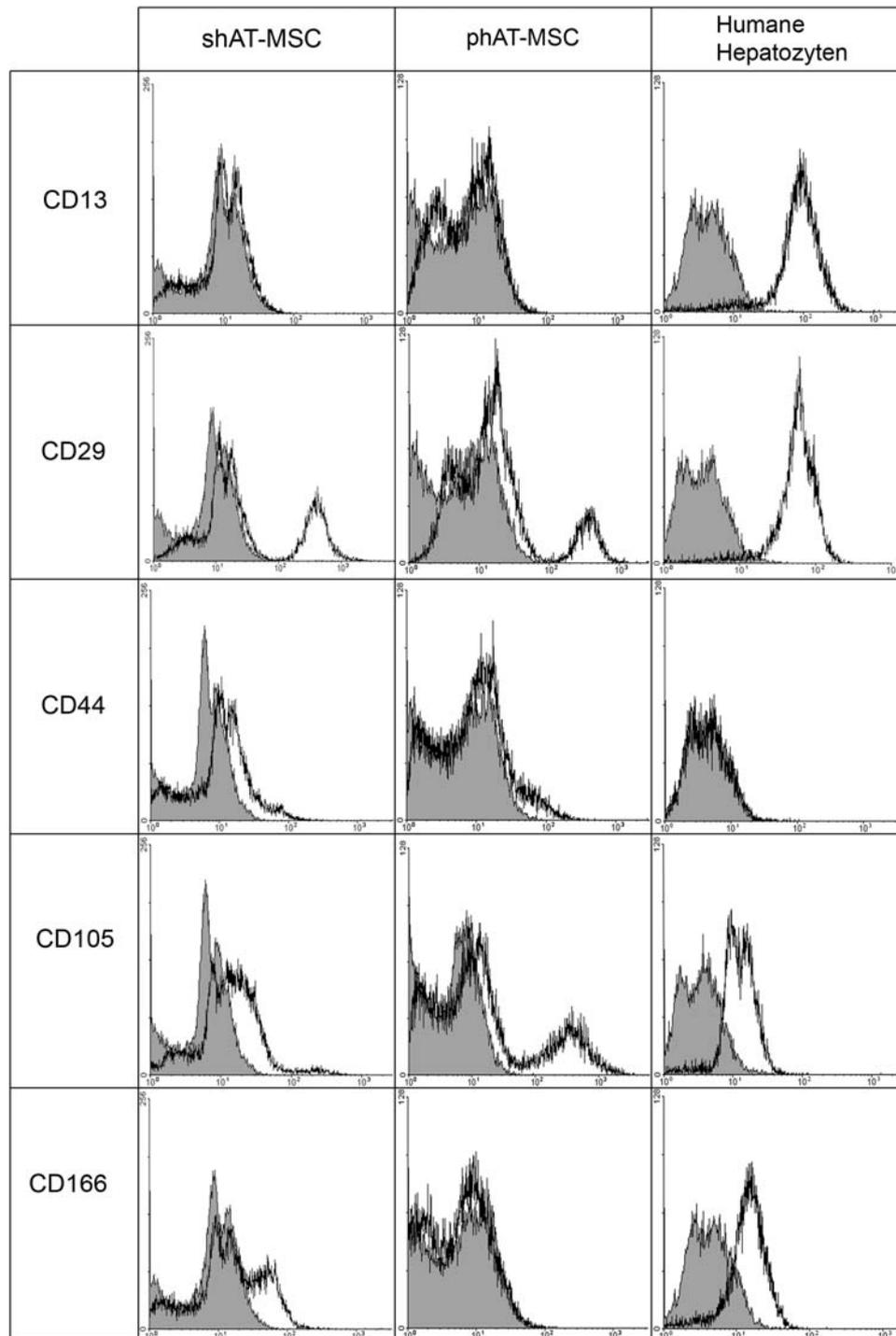


Abbildung 21: Expression von Oberflächenantigenen auf humanen hAT-MSC im Leberparenchym von transplantierten Pfp/Rag2^{-/-}-Mäusen. Die hAT-MSC wurden vor der Transplantation in die Mauslebern für 14 Tage *in vitro* in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Nach zehn Wochen wurden die Hepatozyten isoliert und durchflußzytometrisch mit den humanspezifischen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD13, CD29, CD44, CD105 und CD166 analysiert. Humane Hepatozyten dienten dabei als Referenz. Die grau unterlegten Flächen repräsentieren die

IgG-Isotyp Kontrollen, die freien Flächen die spezifischen Antikörper. Die Abbildung zeigt eins von zwei Experimenten, die in Tabelle 9 zusammengefasst sind.

| | shAT-MSC (nd) (V1 / V2) | shAT-MSC Hd14 (V1 / V2) | phAT-MSC (nd) (V1 / V2) | phAT-MSC Hd14 (V1 / V2) |
|-------|--|--|--|--|
| CD13 | 0 / 0 | 0 / 0 | 0 / 0 | 0 / 0.8 |
| CD26 | (-) / 1.4 | (-) / 20.9 | (-) / 0.3 | (-) / 4.1 |
| CD29 | 1.0 / 1.7 | 21.2 / 26 | 0.7 / 1.2 | 7.5 / 12 |
| CD44 | 2.3 / 1.4 | 4.5 / 8.5 | 3.5 / 2.2 | 5.6 / 6.0 |
| CD105 | 2.9 / 2.7 | 2.5 / 10.5 | 1.2 / 0 | 12.5 / 15.6 |
| CD166 | 0 / 0 | 22.1 / 20.3 | 0 / 0 | 0 / 1.9 |

Tabelle 9: Prozentualer Anteil von humanen Zellen in Hepatozytenpräparationen aus mit hAT-MSC transplantierten Pfp/Rag2^{-/-}-Mäusen. Die Hepatozyten wurden zehn Wochen nach Transplantation von undifferenzierten (nd) und von 14 Tage *in vitro* hepatogen vordifferenzierten hAT-MSC (d) präpariert und durchflußzytometrisch analysiert. Zwei unabhängige Versuche (V1 / V2) wurden durchgeführt; (-) nicht untersucht.

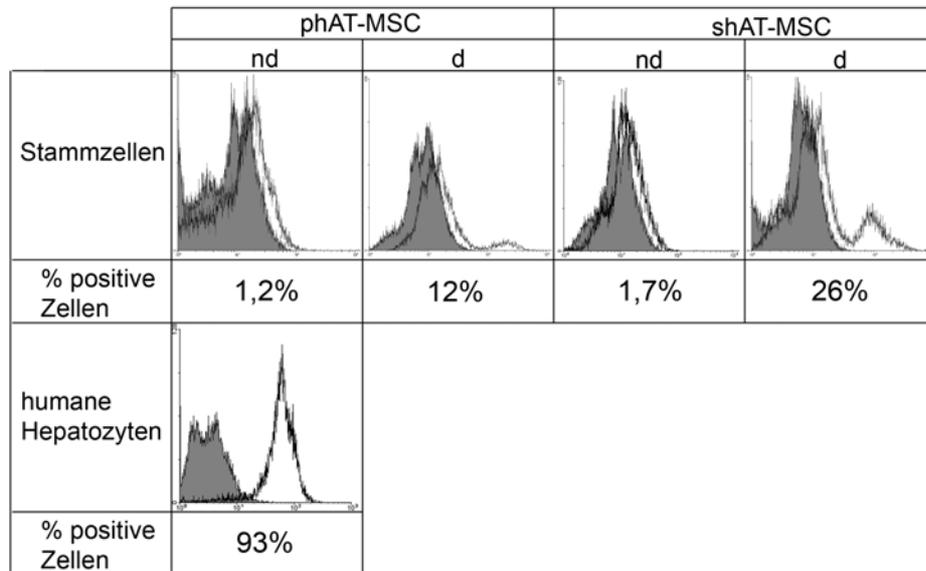
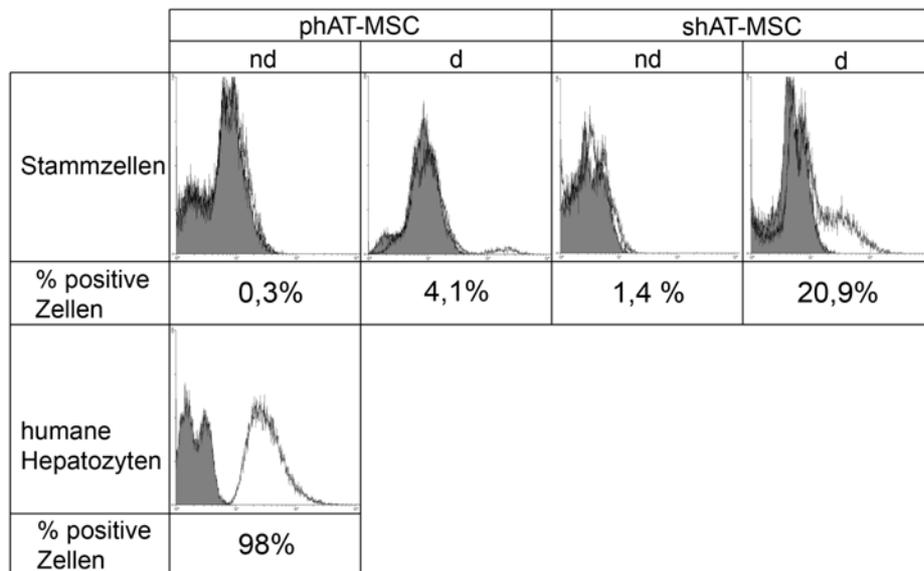
A**B**

Abbildung 22: Quantifizierung von transplantierten humanen Zellen in der Hepatozytenpräparation aus Lebern von Pfp/Rag2^{-/-}-Empfängertieren. Undifferenzierte (nd) oder 14 Tage *in vitro* hepatogen vordifferenzierte (d) hAT-MSC wurden in die Empfängerlebern transplantiert. (A) Nach 10 Wochen wurden die Hepatozyten aus der Mausleber isoliert und durchflußzytometrisch unter Verwendung des humanspezifischen anti-CD29 Antikörpers analysiert. (B) In einem zweiten Experiment wurden die gleichen Zellen mit dem leberspezifischen anti-human CD26 Antikörper analysiert. Humane Hepatozyten dienten als Referenz, die graue Fläche unter der Kurve stellt die IgG Isotyp-Kontrolle dar, die weiße Fläche unter der Kurve repräsentiert die spezifischen Antikörper. Es wurden jeweils dreimal 5×10^4 Zellen analysiert.

3.3 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Differenzierung

Die Differenzierung von MSC zu Zellen mit hepatozytären Eigenschaften erfordert die Zugabe von Wachstumsfaktoren im Differenzierungsmedium (52, 64). Insbesondere EGF und HGF scheinen dabei eine bedeutende Rolle zu spielen. Durch die Bindung des HGF an seinen Rezeptor (HGF-Rezeptor, c-met) kommt es zur Phosphorylierung des mit E-Cadherin assoziierten β -Catenins an Tyrosin 654 und 670 durch die intrinsische Tyrosinkinaseaktivität des c-met (100). Die Phosphorylierung des β -Catenins führt zu verminderten Zell-Zellkontakten und zur Kerntranslokation des β -Catenins (102). Das über Tyr^{654, 670} phosphorylierte β -Catenin wird, im Gegensatz zu dem Ser³³, Ser³⁷ und Tyr⁴¹ phosphorylierten β -Catenin, in den Kern transloziert (102). Hierdurch könnten Zielgene des Wnt/ β -Catenin Signalweges aktiviert und die Differenzierung beeinflusst werden. Zur Untersuchung der Beteiligung des β -Catenin Signalweges an der hepato-genen Differenzierung von hAT-MSC, sollte zunächst überprüft werden, ob eine Differenzierung ohne die Wachstumsfaktoren EGF und HGF möglich ist. Stellvertretend für phAT-MSC und shAT-MSC wurden die Untersuchungen nur mit phAT-MSC durchgeführt. Die phAT-MSC wurden im Differenzierungsmedium nach dem angegebenen Protokoll mit und ohne Faktoren kultiviert und die Proliferationsrate sowie die Harnstoffsyntheserate bestimmt. In Gegenwart der Wachstumsfaktoren war die Zellzahl nach 21 Tagen im Differenzierungsmedium ca. 5-fach gegenüber der Zellzahl zu Beginn der Differenzierung (nd) erhöht. Dem gegenüber war die Zellzahl ohne Zugabe der Faktoren nach 21 Kulturtagen gegenüber dem Ausgangswert nur geringfügig erhöht (Abb. 23A). In Gegenwart der Wachstumsfaktoren war die Harnstoffsyntheserate im Kulturverlauf 3-6-fach erhöht gegenüber der Syntheserate zu Beginn der Differenzierung. Ohne Zugabe der Faktoren lag die Harnstoffsyntheserate unter der Nachweisgrenze des Tests (Abb. 23B).

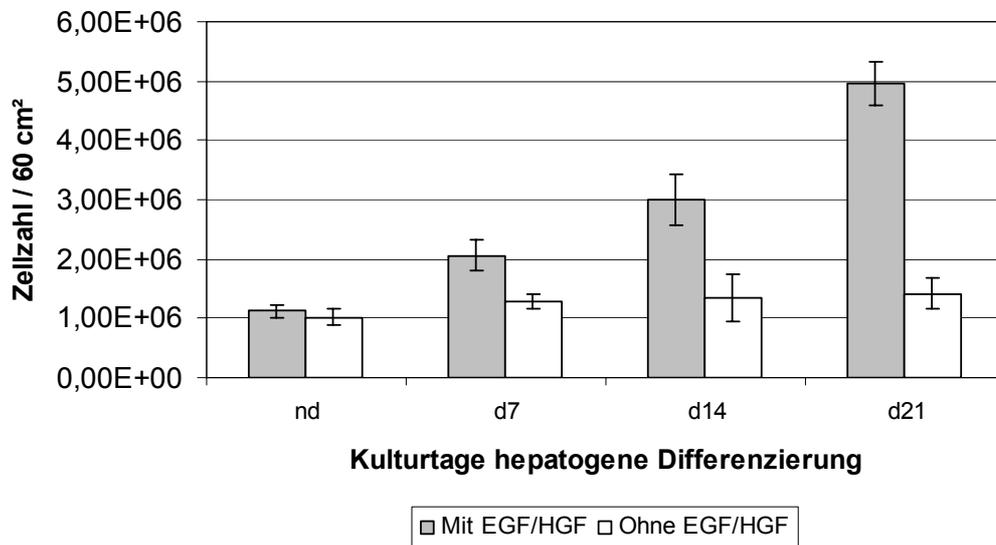
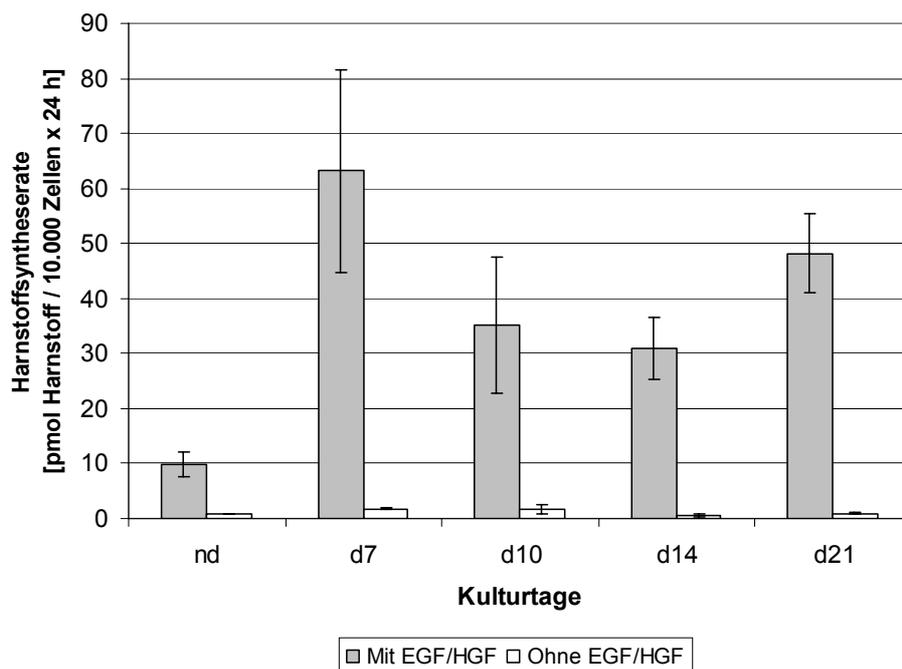
A**Proliferation phAT-MSC****B**

Abbildung 23: Einfluss der Wachstumsfaktoren EGF und HGF auf die Proliferationsrate und die Harnstoffsyntheserate in phAT-MSC. (A) phAT-MSC wurden mit oder ohne HGF/EGF hepatogen differenziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Zellzahl auf der Kulturschale (60 cm²) bestimmt. (B) Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Harnstoffkonzentration von undifferenzierten (nd) und differenzierten (d) phAT-MSC mit und ohne EGF/HGF im Überstand bestimmt.

Durch semiquantitative RT-PCR wurde gezeigt, dass nach 21 Tagen Kultur im hepatogenen Differenzierungsmedium ohne Wachstumsfaktoren die hepatozyten-spezifischen Transkripte für Albumin und CD26 gar nicht und die der PCK1 nur vermindert gebildet wurden (Abb. 24).

Der Einfluss von HGF und EGF auf die Aktivierung eines hepatozytenspezifischen Promotors sollte untersucht werden. Dazu wurde das Transgen GFP unter der Kontrolle des PCK1-Promotors durch lentiviralen Gentransfer in die phAT-MSC eingebracht. Als Kontrolle dienten phAT-MSC, die GFP unter Kontrolle des konstitutiven Ubiquitin-Promotors erhielten. Im Fluoreszenzmikroskop stellte sich die Expression des GFP unter Ubiquitin-Promotorkontrolle nach 21 Tagen Kultur im Differenzierungsmedium mit und ohne Faktoren ähnlich dar wie in undifferenzierten Zellen. Dies bestätigte sich auch in der *Western Blot*-Analyse. Die GFP-Menge war zu allen ausgewählten Zeitpunkten der Kultur identisch. Unter PCK-Promotorkontrolle war die GFP-Expression nach 21 Kulturtagen im hepatogenen Differenzierungsmedium mit Faktoren deutlich gegenüber der Kultur in Abwesenheit der Faktoren erhöht. In der *Western Blot*-Analyse war eine stärkere Zunahme der GFP-Menge im Kulturverlauf mit Faktoren gegenüber dem Kulturverlauf ohne Faktoren festzustellen (Abb. 25). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigten zudem eine geringere Zelldichte bei phAT-MSC, die ohne EGF und HGF im Medium kultiviert worden waren.

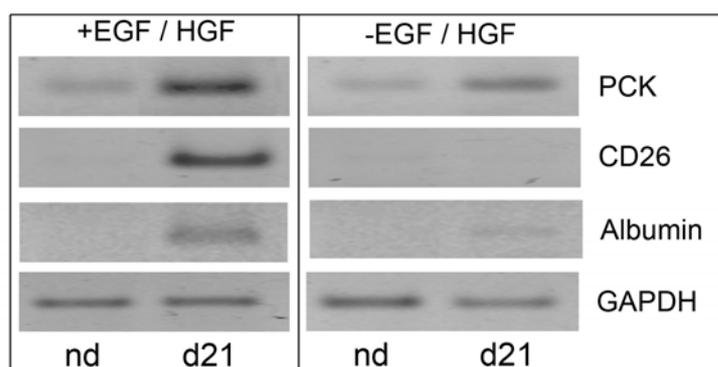


Abbildung 24: Leberspezifische Genexpression in phAT-MSC während der Kultur mit und ohne Zugabe der Wachstumsfaktoren EGF und HGF. Die phAT-MSC wurden nicht differenziert (nd) und über 21 Tagen mit oder ohne EGF/HGF hepatogen differenziert (d21). Die Expression von leberspezifischen Genen wurde mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen. GAPDH diente als Referenz.

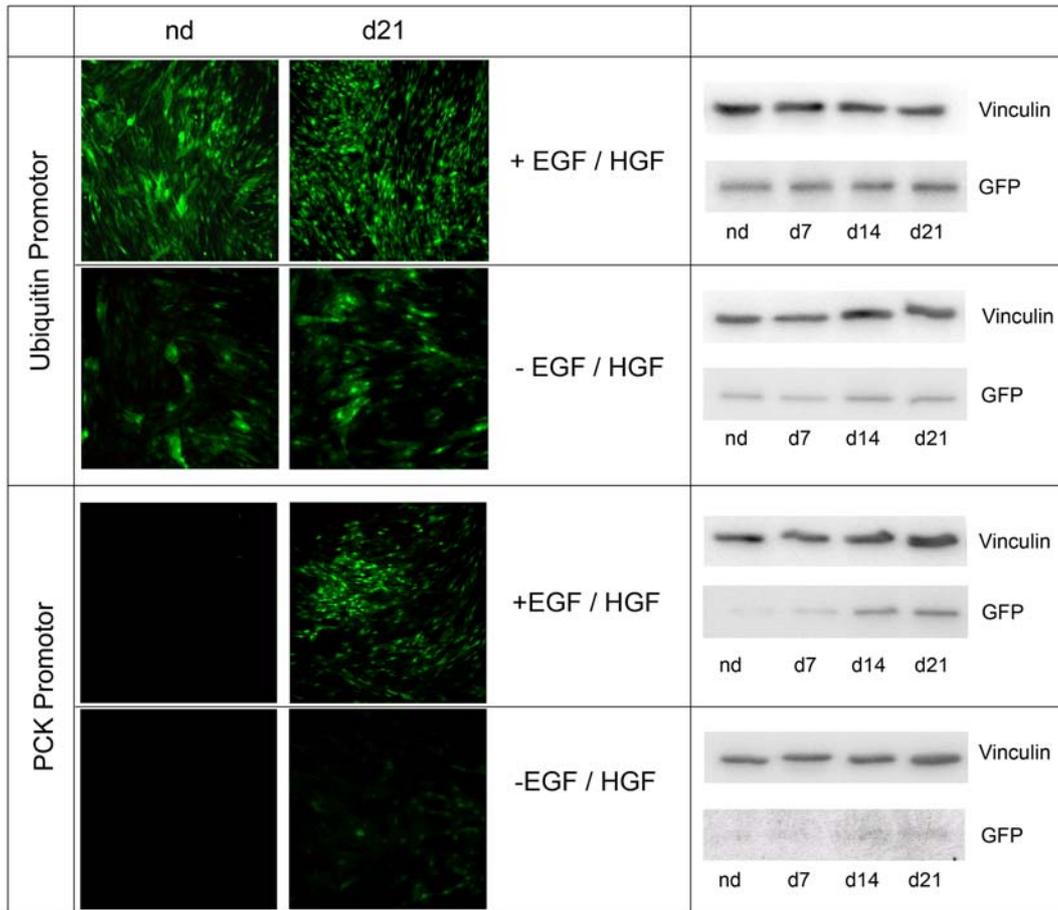


Abbildung 25: Aktivierung des leberspezifischen PCK1-Promotors während der Kultur von phAT-MSC in Medium mit und ohne Zugabe von EGF/HGF. Die Expression des transgenen GFP unter Kontrolle des PCK1-Promotors oder des Ubiquitin-Promotors wurde von nicht differenzierten phAT-MSC (nd) und nach 21-tägiger hepatogener Differenzierung mit und ohne Faktoren (d21) fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Weiterhin wurde die GFP-Expression unter der Kontrolle des leberspezifischen PCK1-Promotors und des konstitutiven Ubiquitin-Promotors über den Kulturverlauf (nd-d21) mittels *Western Blot*-Analyse dargestellt. Vinculin diente als Ladungskontrolle, Auftragsmenge jeweils 25 µg/Fraktion.

3.4 Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalweges auf die hepatogene Differenzierung von hAT- MSC

3.4.1. Die Translokation des β -Catenin in den Zellkern während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC

Die unter 3.3 beschriebenen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass, vermittelt durch die HGF/EGF-Wirkung, der Wnt/ β -Catenin Signalweg an der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC beteiligt ist. Bei der osteogenen Differenzierung von MSC wird der Wnt/ β -Catenin Signalweg über den Fzd-Rezeptor aktiviert (94). Während der osteogenen Differenzierung von hAT-MSC scheint zudem die Expression endogener Wnt-Zielgene die Differenzierung zu begünstigen (122). Daher sollte untersucht werden, ob der Wnt/ β -Catenin Signalweg tatsächlich an der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC beteiligt ist. Zunächst wurde die Lokalisation des cytoplasmatischen β -Catenins in nicht differenzierten (nd) und über 7 und 14 Tagen hepatogen differenzierte phAT-MSC und shAT-MSC (d7 und d14) untersucht. Während die undifferenzierten hAT-MSC eine gleichmäßige Verteilung von β -Catenin im Cytoplasma zeigten, kam es im Verlauf der Differenzierung bei beiden Populationen von hAT-MSC zur Verschiebung des β -Catenins in den Zellkern. Anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der phAT-MSC und shAT-MSC (Abb. 26, jeweils obere Reihe), konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das β -Catenin im Zellkern lokalisiert oder mit diesem assoziiert war. Daher wurden die Zellkerne (Abb. 26, jeweils obere Reihe, weißer Kasten) mit dem umgebenden Cytoplasma in einer Schichtaufnahme (0,1 μ m) konfokalmikroskopisch untersucht (Abb. 26, jeweils untere Reihe). Die Aufnahmen zeigen, dass das β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung der hAT-MSC anfangs im Cytoplasma vorlag, dann aber hauptsächlich im Zellkern. Durch *Western Blot*-Analysen konnte gezeigt werden, dass das cytosolische, phosphorylierte β -Catenin im Laufe der Differenzierung abnahm. Die Gesamtmenge des β -Catenins variierte über den Kulturverlauf, war aber zu allen Zeitpunkten höher als das phosphorylierte cytosolische β -Catenin.

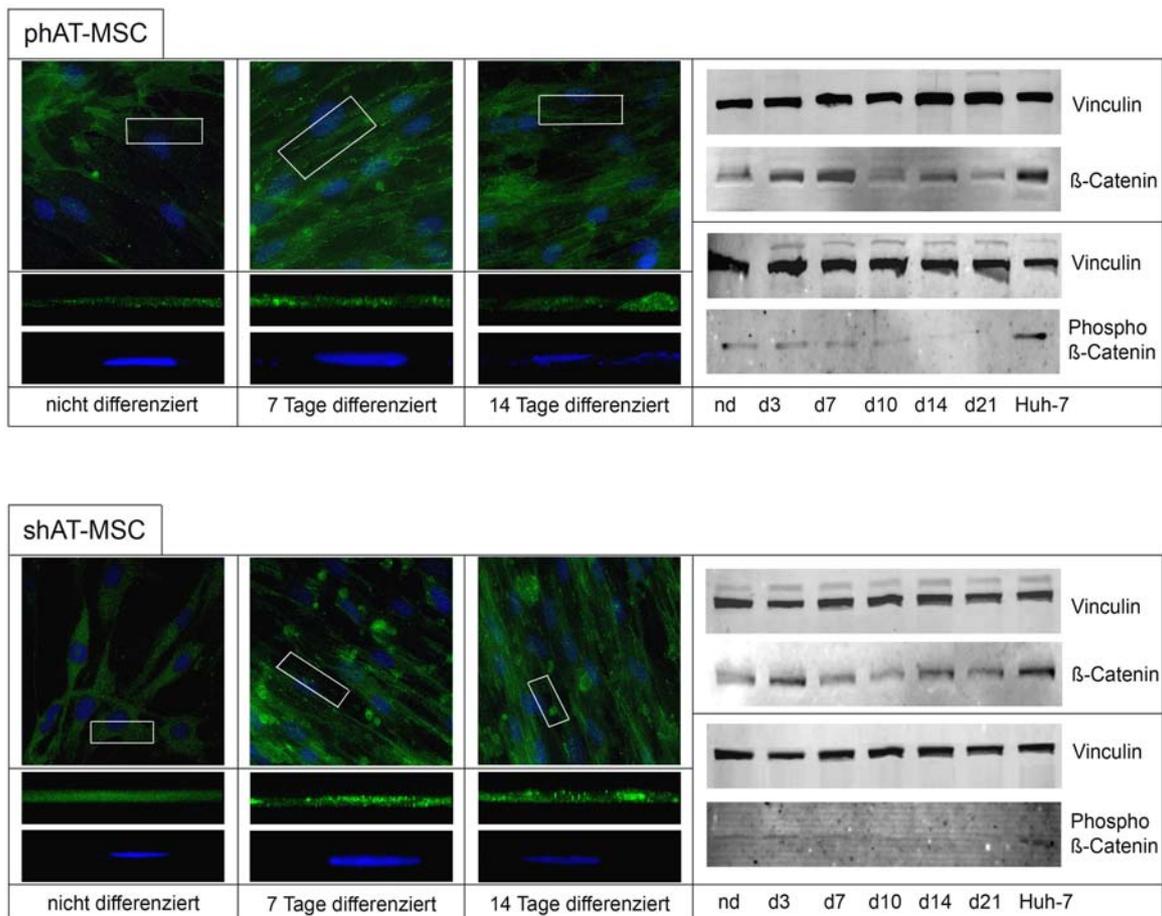


Abbildung 26: Translokation des β -Catenins in den Zellkern während der hepatogenen Differenzierung von phAT-MSC und shAT-MSC. Linke Abbildungshälfte: Die Zellen wurden nicht differenziert (nd) und für 7 bzw. 14 Tage (d7 und d14) in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert und die Lokalisation des β -Catenins (grün) nach immunocytochemischer Detektion im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die in den oberen Reihen eingezeichneten Rechtecke geben Bereiche an, die in den jeweils darunter liegenden Reihen als konfokale Schichtaufnahmen der Lokalisation des β -Catenins in Relation zum Zellkern wiedergegeben werden (Vergrößerungen 600x). Rechte Bildhälfte: *Western Blot*-Analysen zur Darstellung der Gesamtmenge an β -Catenin und der Menge des phosphorylierten β -Catenins in undifferenzierten (nd) und unterschiedlich lange in hepatogenem Differenzierungsmedium kultivierten (d3-d21) hAT-MSC. Als Ladungskontrolle diente Vinculin. Gesamtprotein aus Huh-7-Zellen diente als Positivkontrolle (25 μ g Gesamtprotein/Fraktion).

3.4.2 Lokalisation des β -Catenin im Zellkern in Abhängigkeit von der Aktivität der Kinase GSK3 beta

Die Translokation des β -Catenins in den Zellkern während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC legt die Beteiligung eines durch β -Catenin vermittelten Signalwegs nahe. Bis hierher konnte nicht unterschieden werden, ob eine Kernlokalisierung des β -Catenin durch die Wachstumsfaktoren HGF/EGF und die dadurch induzierte Phosphorylierung durch die intrinsische c-met Tyrosinkinase mit nachfolgender Translokation des β -Catenins in den Zellkern oder durch die GSK3 β als zentrale Komponente des klassischen kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalwegs zustande kommt. Zu Überprüfung, ob die Kerntranslokation des β -Catenins in Zusammenhang mit der GSK3 β steht, wurde die Menge an nicht phosphoryliertem β -Catenin in Gegenwart eines Hemmstoffs der GSK3 β , (2_Z, 3_E)-6-bromindirubin-3_oxime (BIO), untersucht. BIO inhibiert die GSK3 β , so dass die Ser⁹ Phosphorylierung nicht mehr auf das β -Catenin übertragen werden kann. Dies führt zur Dissoziation des Enzymkomplexes aus APC, Axin, GSK3 und β -Catenin. Infolgedessen wird β -Catenin nicht phosphoryliert, und es kommt zur Kerntranslokation des β -Catenins und zur Aktivierung der Transkription von Wnt-Zielgenen (108, 123). Nach der Behandlung mit 500 nM BIO konnte auch in undifferenzierten hAT-MSC eine Lokalisation des β -Catenins im Zellkern beobachtet werden (Abb. 27; vergl. Abb. 26). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 27, jeweils obere Reihe) zeigen eine verminderte Menge cytoplasmatischen β -Catenins in den undifferenzierten hAT-MSC. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 27, jeweils untere Reihen) zeigen in den phAT-MSC eine deutlichere Lokalisation des β -Catenins im Kern im Vergleich zu shAT-MSC. Im Vergleich zu den nicht mit BIO behandelten Zellen (Abb. 26) zeigten die mit 500 nM BIO behandelten phAT-MSC und die shAT-MSC am Tag 7 und 14 der Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium eine stärkere Lokalisation des β -Catenins im Zellkern. In den *Western Blot*-Analysen war kaum noch phosphoryliertes β -Catenin nachweisbar. Lediglich nach 21 Tagen in hepatogenem Differenzierungsmedium waren geringe Mengen des phosphorylierten β -Catenins in den phAT-MSC erkennbar. Ähnlich wie bei unbehandelten hAT-MSC (Abb. 26) variierte die Gesamtmenge des β -Catenins im Kulturverlauf.

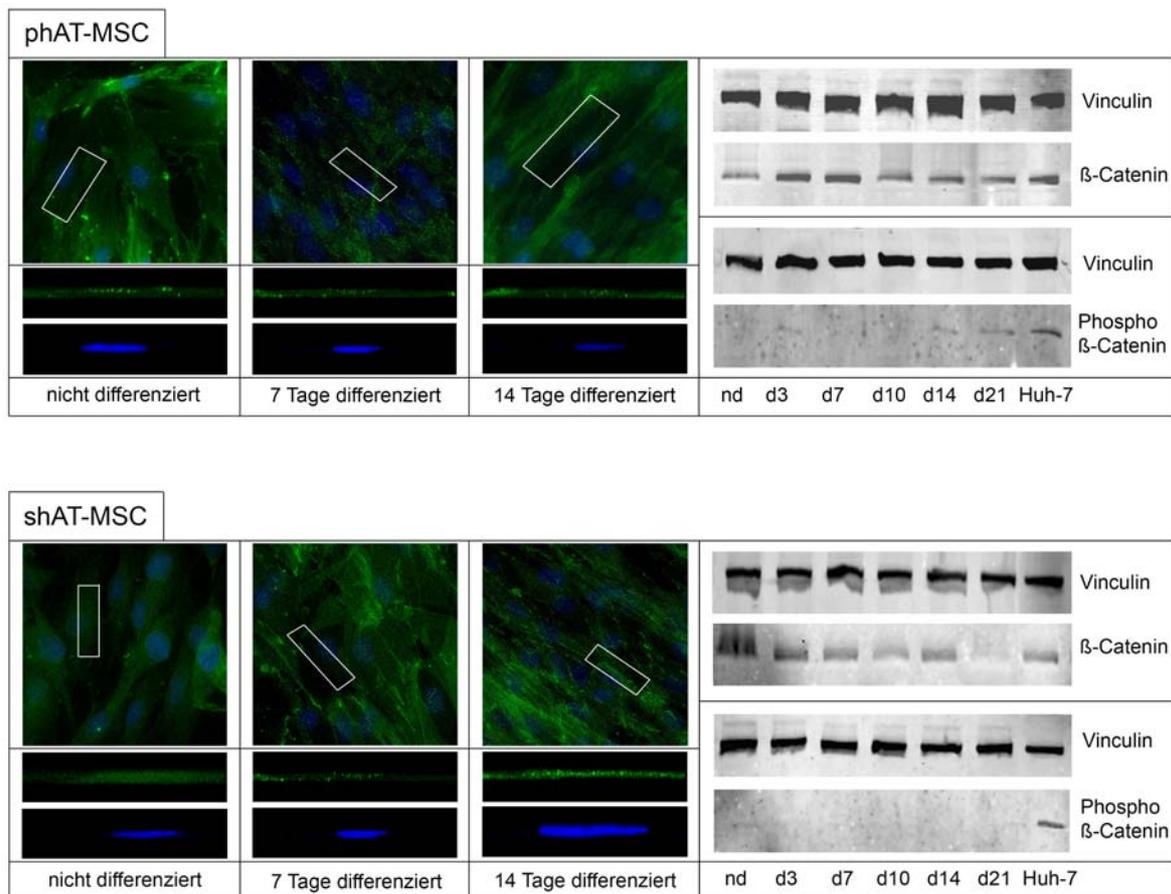


Abbildung 27: Translokation des β -Catenins in den Zellkern nach Behandlung mit (2_Z,3_E)-6-bromoindirubin-3_oxime (BIO) während der hepatogenen Differenzierung von phAT-MSC und shAT-MSC. Linke Abbildungshälfte Immuncytochemie: Die Zellen wurden für 7 bzw. 14 Tage in hepatogenem Differenzierungsmedium in Gegenwart von 500 nM BIO kultiviert und die Lokalisation des β -Catenins nach immuncytochemischer Detektion im Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zu undifferenzierten hAT-MSC untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die in den oberen Reihen eingezeichneten Rechtecke geben Bereiche an, die in den jeweils darunter liegenden Reihen konfokale Schichtaufnahmen der Lokalisation des β -Catenins (grün) in Relation zum Zellkern (blau) zeigen (Vergrößerungen 600x). Rechte Bildhälfte Western Blot-Analysen: Die Gesamtmenge an β -Catenin und der Menge des phosphorylierten β -Catenins in undifferenzierten (nd) und unterschiedlich lange in hepatogenem Differenzierungsmedium mit 500 nM BIO kultivierten (d3-d21) hAT-MSC wurden verglichen. Als Ladungskontrolle diente Vinculin. Gesamtprotein aus Huh-7-Zellen diente als Positivkontrolle (25 μ g Gesamtprotein/Fraktion).

Immuncytochemische Analysen der zellulären Verteilung der Gesamt-GSK3 β und der an Ser⁹ phosphorylierten GSK3 β zeigten, dass die GSK3 β im gesamten Cytoplasma, die phospho-GSK3 β perinukleär verteilt war. Beide Formen waren in undifferenzierten phAT-MSC niedriger im Vergleich zu Zellen, die 14 Tage in heaptogenem Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. In den shAT-MSC waren beide Formen in undifferenzierten und hepatogen differenzierten Zellen etwa gleich. Diese immuncytochemischen Befunde spiegelten sich auch in der korrespondierenden *Western Blot*-Analyse wieder (Abb. 28, ohne BIO). In Gegenwart von 500 nM BIO waren beide Formen in undifferenzierten hAT-MSC niedriger im Vergleich zu Zellen, die 14 Tage in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert worden waren. Die GSK3 β war cytoplasmatisch, die phospho-GSK3 β perinukleär lokalisiert (Abb. 28, 500 nM BIO). In beiden hAT-MSC-Populationen war die Menge der am Ser⁹ phosphorylierten GSK3 β durch die BIO-Behandlung gegenüber unbehandelten Zellen erhöht.

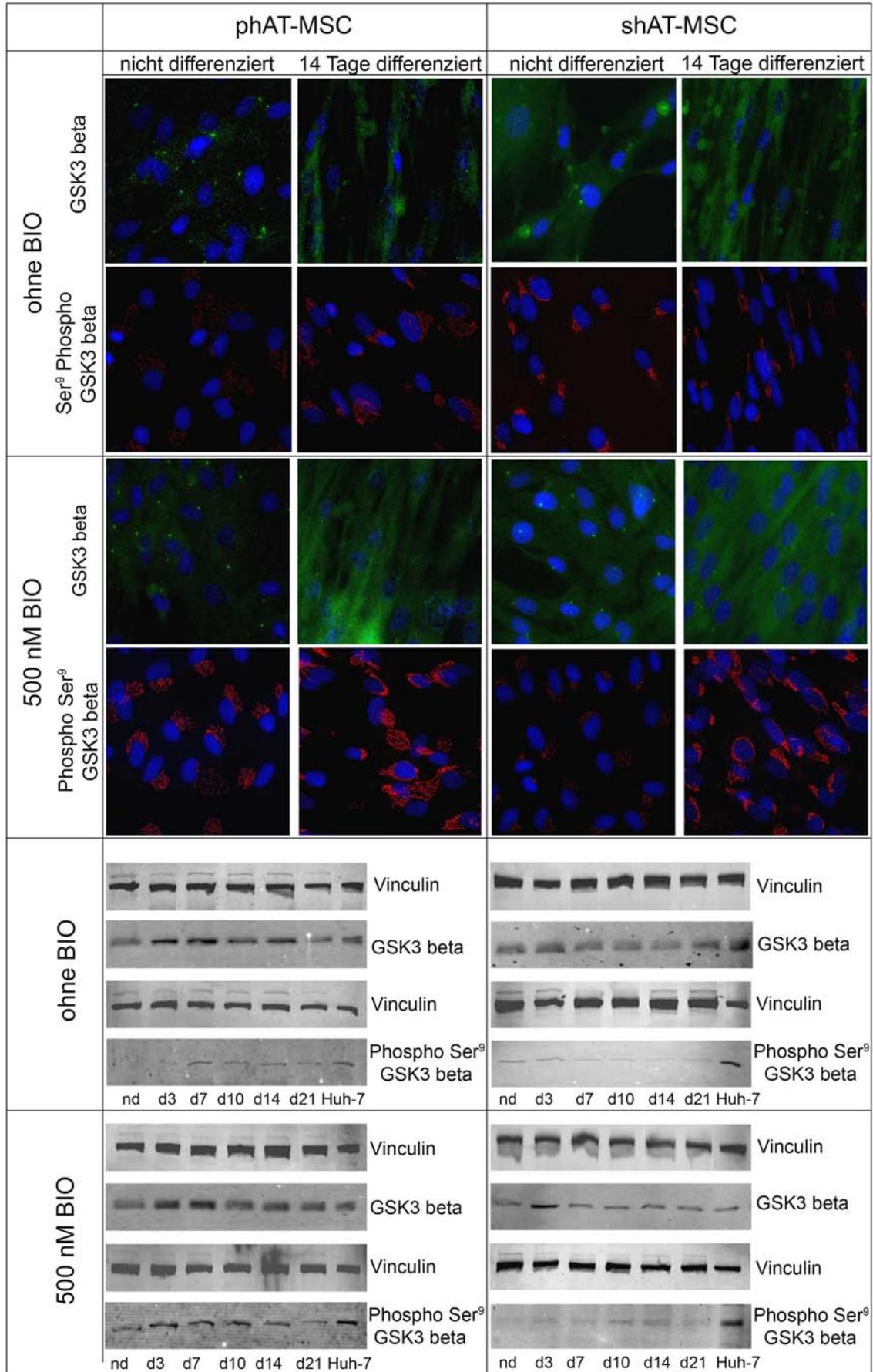


Abbildung 28: Zelluläre Lokalisation und Veränderungen der GSK3 β in hAT-MSC während der hepatogenen Differenzierung ohne und mit 500 nM BIO. Obere Bildhälfte Immuncytochemie: Die Zellen wurden für die angegebenen Zeiten in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert und die Lokalisation der Gesamt-GSK3 β (grün) sowie der phospho-GSK3 β (rot) nach immuncytochemischer Detektion im Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zu undifferenzierten hAT-MSC untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. (Vergrößerungen 600x). Untere Bildhälfte *Western Blot*-Analysen: Spezifische Darstellung der Gesamtmengen an GSK3 β und an phosphoryliertem GSK3 β in undifferenzierten (nd) und über unterschiedlich lange Zeiträume (d3-d21) hepatogen differenzierten hAT-MSC. Als Ladungskontrolle diente Vinculin. Gesamtprotein aus Huh7-Zellen diente als Positivkontrolle (25 μ g Gesamtprotein/Fraktion).

3.4.3 TCF/Lef-vermittelte Transkription während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC

Die Translokation des cytoplasmatischen β -Catenins in den Zellkern sollte zur Aktivierung der Transkription von Wnt/ β -Catenin Zielgenen führen. Diese erfolgt über die Bindung von β -Catenin an Proteine der TCF/Lef-Familie. Dieser Komplex bindet anschließend an TCF/Lef-Bindemotive der DNA (122). Es ist jedoch auch möglich, das durch die Bindung von Groucho an β -Catenin eine Repression der Wnt-Zielgene erfolgt (124). Um zu untersuchen, ob die Translokation von β -Catenin in den Zellkern (Abb. 26, 27) zur Stimulation der TCF/Lef-vermittelten Gentranskription führt, wurde ein Lentivirus konstruiert, der die *Firefly Luciferase (FFL)* als Reporter gen unter der Kontrolle einer achtfachen Wiederholung des TCF-4/Lef-Bindemotivs besaß (125). Nach Infektion mit diesem Virus wurden die hAT-MSC ohne und unter Zugabe von 500 nM BIO für 28 Tage in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert und die *FFL*-Aktivität als Maß der Stimulation der TCF/Lef-vermittelten Genexpression drei Tage vor Beginn der Differenzierung und zu den angegebenen Tagen der Differenzierung luminometrisch bestimmt. Drei Tage vor Beginn der Differenzierung war die Luciferaseaktivität in phAT-MSC (Abb. 29A) und shAT-MSC (Abb. 29B) am höchsten und nahm im Verlauf der Kultur tendenziell ab. In Gegenwart von 500 nM BIO lag die Aktivität deutlich über den Werten ohne die Zugabe von BIO. Auch hier nahm die Aktivität im Kulturverlauf tendenziell ab, zeigte aber ein punktuell Maximum am Tag 21 der Differenzierung von phAT-MSC und am Tag 14 der Differenzierung von shAT-MSC (Abb. 29, graue Säulen). Insgesamt lag die Aktivität

in shAT-MSC ca. 2-3-fach über der in phAT-MSC gemessenen. Während nach 28 Kulturtagen die Aktivität in phAT-MSC mit und ohne BIO gleich war, lag sie in shAT-MSC in Gegenwart von BIO noch 3-fach über der ohne Zugabe von BIO gemessenen Aktivität.

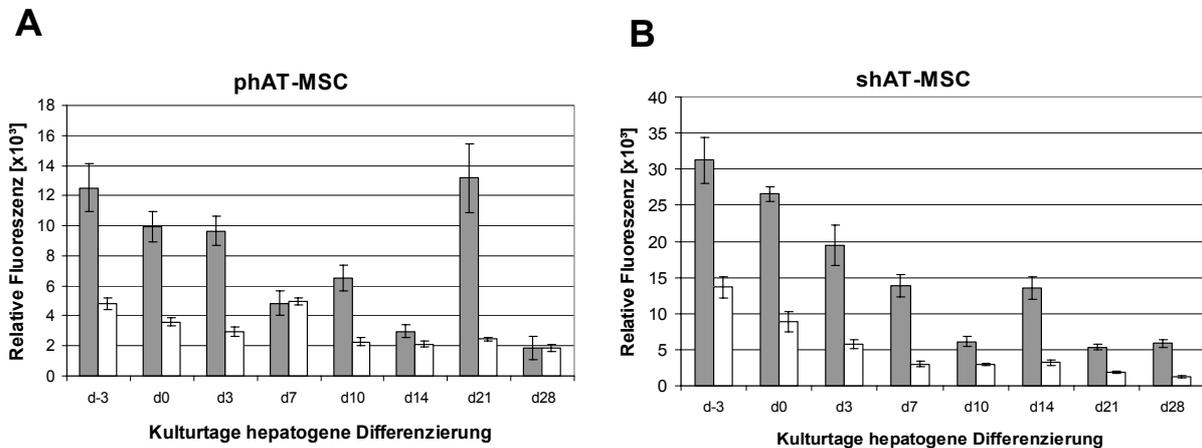


Abbildung 29: Expression der *Firefly Luciferase (FFL)* unter der Kontrolle des TCF-4/Lef-Bindemotivs in hAT-MSC vor und im Verlauf der hepatogenen Differenzierung. Die Luciferaseaktivität wurde drei Tage vor der Differenzierung (d-3), zum Beginn (d0) der Differenzierung und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung in hepatogenem Differenzierungsmedium ohne (weiße Säulen) und unter Zugabe von 500 nM BIO (graue Säulen) luminometrisch bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar. (A) phAT-MSC; (B) shAT-MSC

Die Abnahme der TCF-4/Lef abhängigen FFL-Expression von hohen Werten vor und zu Beginn der Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium könnte ursächlich auf die verminderte Expression von TCF-4 mit zunehmender Kulturdauer zurück zu führen sein. *Western Blot*-Analysen ergaben, dass die Menge von TCF-4 ähnlich der gemessenen Luciferaseaktivität während der hepatogenen Differenzierung der hAT-MSC schwankte. Tendenziell waren auch hier die Mengen an TCF-4 vor und zum Beginn der Differenzierung höher als zu späteren Zeitpunkten der Kultur. Die Zugabe von BIO hatte auf die Mengen an TCF-4 keinen signifikanten Einfluss (Abb. 30). Die mit der hepatogenen Differenzierung der hAT-MSC einhergehenden Translokation des β -Catenins in den Zellkern (Abb. 26, 27) war demnach überlagert von einer Abnahme des TCF-4.

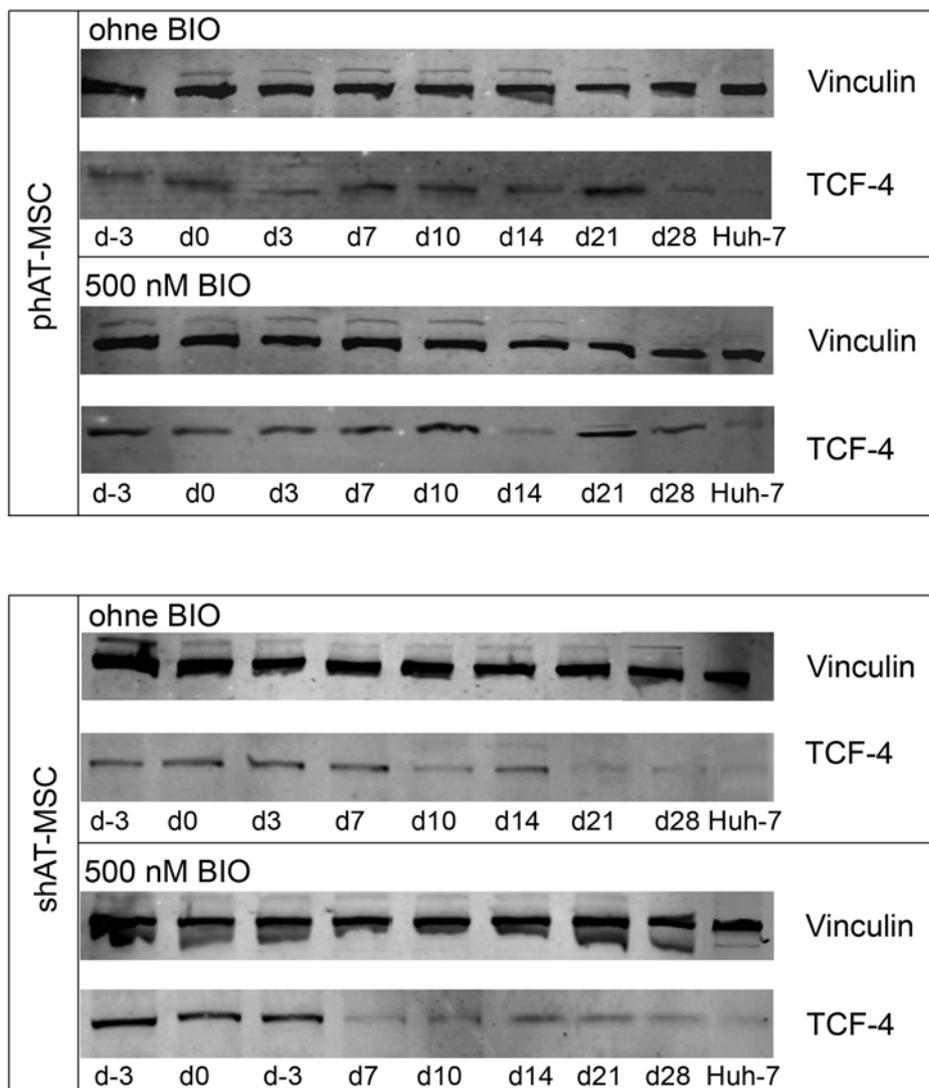


Abbildung 30: Expression von TCF-4 vor und während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC ohne und unter Zugabe von 500 nM BIO. Gesamtprotein der Zellen wurde drei Tage vor der Differenzierung (d-3), zum Beginn der Differenzierung (d0) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium gewonnen und der relative Gehalt an TCF-4 im *Western Blot* analysiert. Cytosolextrakte aus Huh-7-Zellen dienten als Positivkontrollen, Vinculin diente als Ladungskontrolle (25 µg Gesamtprotein/Fraktion).

Zur weiteren Klärung, ob die Translokation des β -Catenin während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC zu Veränderungen der β -Catenin-abhängigen Gentranskription führte, wurde die Expression von β -Catenin-Zielgenen im *Western Blot*-Verfahren untersucht. Zu diesen Proteinen gehört das mRNA stabilisierende Protein *IGF2 mRNA binding protein 1* (IMP-1), welches unter anderem die β -Actin mRNA stabilisiert und somit am Auf- und Umbau des Cytoskeletts beteiligt ist (126). Ein weiteres Zielgen des β -Catenin Signalweges ist der *Lymphoid enhancer binding factor 1* (Lef-1), der zusammen mit β -Catenin und TCF an die TCF/Lef-Bindemotive der DNA bindet (98). Als weiteres Zielgen des β -Catenins gilt das Cyclin D1, das in der Leber HGF-abhängig induziert werden kann (127). Entsprechend spielt es eine entscheidende Rolle in der Leberregeneration und wird nach partieller Hepatektomie bis zur 20-fachen Menge heraufreguliert (128). Während IMP-1 und Lef-1 in undifferenzierten phAT-MSC niedriger exprimiert wurden als in hepatogen differenzierten, war die Menge an Cyclin D1 in undifferenzierten und differenzierten phAT-MSC etwa gleich. Die BIO-Behandlung führte dazu, dass auch in undifferenzierten phAT-MSC IMP-1 und Lef-1 wie in differenzierten hAT-MSC exprimiert wurde. Der verwendete Antikörper erkannte neben Cyclin D1 (33,7 kDa) auch Cyclin D3 (33,5 kDa) und Cyclin D2 (33 kDa), deren Gehalt nach BIO-Behandlung deutlich zunahm (Abb. 31, linke Bildhälfte). In undifferenzierten und differenzierten shAT-MSC wurden IMP-1, Lef-1 und Cyclin D1 gleichermaßen exprimiert. Die Expression von IMP-1 wurde durch die Zugabe von BIO nicht beeinflusst, die Expression von Lef-1 war in mit BIO behandelten Zellen gegenüber den unbehandelten leicht erhöht. Durch BIO-Behandlung konnte auch eine deutliche Zunahme von CyclinD1, D2 und D3 induziert werden (Abb. 31, rechte Bildhälfte).

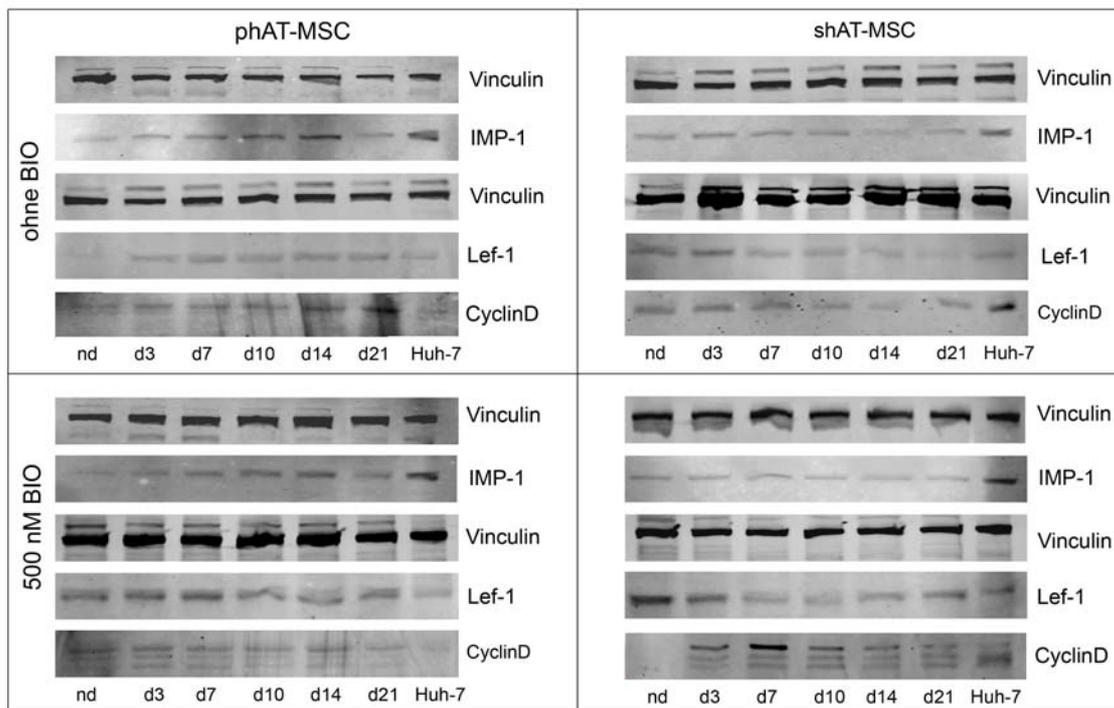


Abbildung 31: Expression von β -Catenin Zielgenen während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC ohne und unter Zugabe von 500 nM BIO. Die Expression von IMP-1, Lef-1 und den Cyclin-Isoformen in undifferenzierten (nd) und für zunehmende Zeiträume in hepatogenem Differenzierungsmedium kultivierten Zellen (d3-d21) wurde mittels *Western Blot*-Analyse untersucht. Cytoleextrakte aus Huh-7-Zellen dienten als Positivkontrollen, Vinculin diente als Ladungskontrolle (25 μ g Gesamtprotein/Fraktion).

3.4.4 Einfluss des Hemmstoffes BIO auf die hepatozytäre Differenzierung sowie auf Komponenten des Wnt/ β -Catenin Signalweges und seiner Zielgene in hAT-MSC

In der Leber ist die Expression der Glutaminsynthetase (GS) auf 1-2 Zellschichten um die Verzweigungen der Zentralvene herum beschränkt. Die GS wird nicht in periportalen Hepatozyten exprimiert. Umgekehrt wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK1) in periportalen, nicht aber in perivenösen Hepatozyten exprimiert (5).

Das Gen der GS ist ein β -Catenin Zielgen, dessen Expression folglich an die Expression des β -Catenins gekoppelt ist. Da in perivenösen Hepatozyten auch kein APC exprimiert ist, das zusammen mit der GSK3 und Axin das β -Catenin destabilisiert, ist in perivenösen Hepatozyten die Expression des β -Catenins und folglich der GS im Vergleich zu periportalen Hepatozyten erhöht. Umgekehrt

exprimieren periportale Hepatozyten APC, das zur Destabilisierung des β -Catenins und damit zur Verminderung der Expression von Zielgenen wie der GS führt. Dies führt auch zur erhöhten Expression von periportalen Markern wie der PCK1 (104, 106). Die Expression der GS war in undifferenzierten hAT-MSC in der *Western Blot*-Analyse nicht nachweisbar (Abb. 32). Auch in hepatogen differenzierten Zellen war die GS nur am Tag 21 der Differenzierung nachweisbar (Abb. 32). Die Expression von APC und PCK1 dagegen war in den hAT-MSC nach 7 Tagen der Differenzierung nachweisbar und blieb bis zum Tag 21 konstant (Abb. 32). Die Behandlung mit 500 nM BIO führte dazu, dass die GS in phAT-MSC von Tag 14 an stark exprimiert und in shAT-MSC bereits nach 7 Tagen Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium deutlich nachweisbar war. Umgekehrt nahm die Expression von APC und PCK1 gegenüber unbehandelten Zellen stark ab.

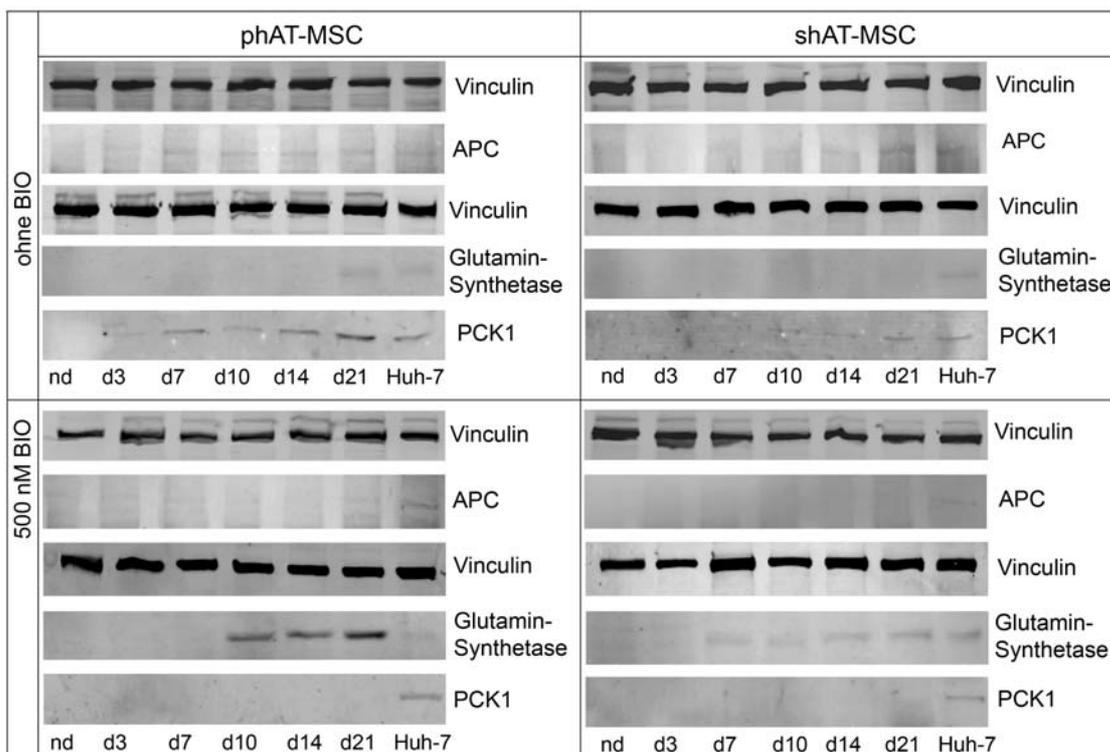


Abbildung 32: *Western Blot*-Analyse zum Nachweis der perivenös exprimierten GS und der periportal exprimierten APC und PCK1 in hAT-MSC während der hepatogenen Differenzierung. Die Expression der Proteine wurde in Zellen, die entweder nicht differenziert (nd) oder über verschiedene Zeiträume in hepatogenem Differenzierungsmedium kultiviert (d7-d21) worden waren, analysiert. Vinculin diente als interne Ladungskontrolle (25 μ g Gesamtproteinmenge/Fraktion), Huh-7-Zellen dienten als Positivkontrolle.

Im Gegensatz zu den hepatozytären Wnt-Zielgenen hatte die Behandlung mit BIO keinen Einfluss auf die Expression von Wnt-unabhängigen Zielgenen wie CD26 und CX32. Erwartungsgemäß wurde die Expression von CD26 durch die Behandlung mit BIO nicht beeinflusst (Abb 33). Die Expression des CD26 nahm sowohl ohne als auch unter Zugabe von 500 nM BIO in den phAT-MSC und den shAT-MSC ab Beginn der Differenzierung stetig zu. Nach zehn Tagen der hepato-genen Differenzierung hatte die CD26-Expression ihr Maximum erreicht und nahm nicht weiter zu. Die Expression des CX32 war in der *Western Blot*-Darstellung nicht und immuncytochemisch nur in den phAT-MSC nachweisbar (Abb. 33). Die Verteilung des CD26 in den shAT-MSC ähnelte zu Beginn der hepato-genen Differenzierung eher dem CD26-Muster von Hepatozyten als die Verteilung in den phAT-MSC. Die CD26-Verteilung war zum Ende der Kultur zwischen den phAT-MSC und den shAT-MSC gleich und ähnelte der dem von Hepatozyten.

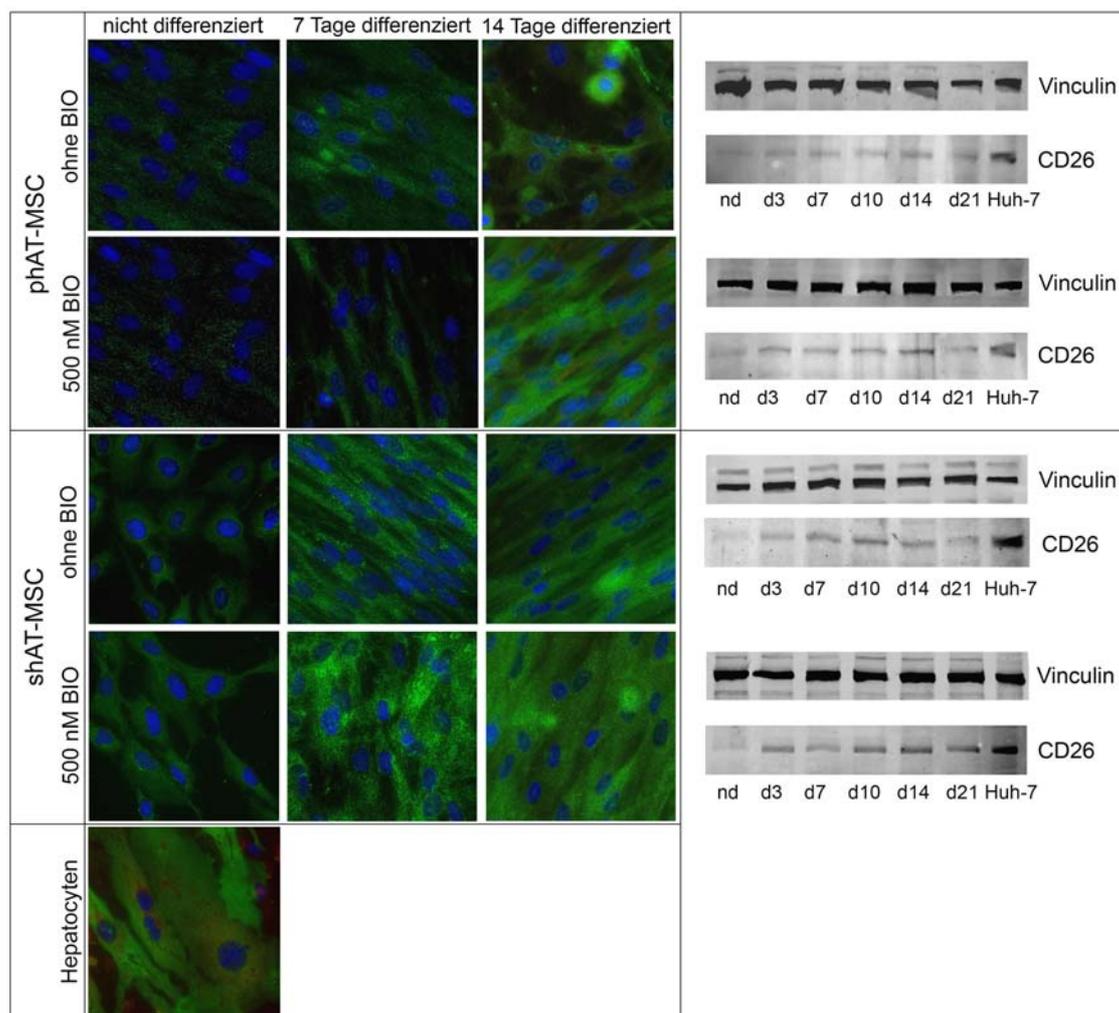


Abbildung 33: Immuncytochemische Analyse von phAT-MSC und shAT-MSC im Zuge der hepato-genen Differenzierung. Die Zellen wurden nicht differenziert (nd) und für 7 bzw. 14

Tage (d7 und d14) im hepatogenen Differenzierungsmedium kultiviert und die Expression von CD26 (grün) und CX32 (rot) untersucht. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Humane Hepatozyten dienten als Positivkontrolle (Vergrößerungen 600x). Rechte Bildhälfte: *Western Blot*-Analyse zur Darstellung der CD26-Expression in undifferenzierten (nd) und für zunehmende Zeiträume (d3-d21) hepatogen differenzierten hAT-MSK. Als Ladungskontrolle diente Vinculin. Gesamtprotein aus Huh-7-Zellen diente als Positivkontrolle (25 µg Gesamtprotein/Fraktion).

Durch die Inhibierung der GSK3 β könnte es zu einer Veränderung in der Expression von Rezeptoren kommen, die einen Einfluss auf die Verteilung des β -Catenins haben. Durch semiquantitative RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von undifferenzierten und hepatogen differenzierten phAT-MSK und shAT-MSK mit BIO keine signifikanten Veränderungen in der Expression des Frizzled1- und des HGF-Rezeptors zur Folge hatten (Abb. 34). Damit übt die BIO-Behandlung von hAT-MSK auf essentielle, vorgeschaltete Signalwege offensichtlich keinen Einfluss aus.

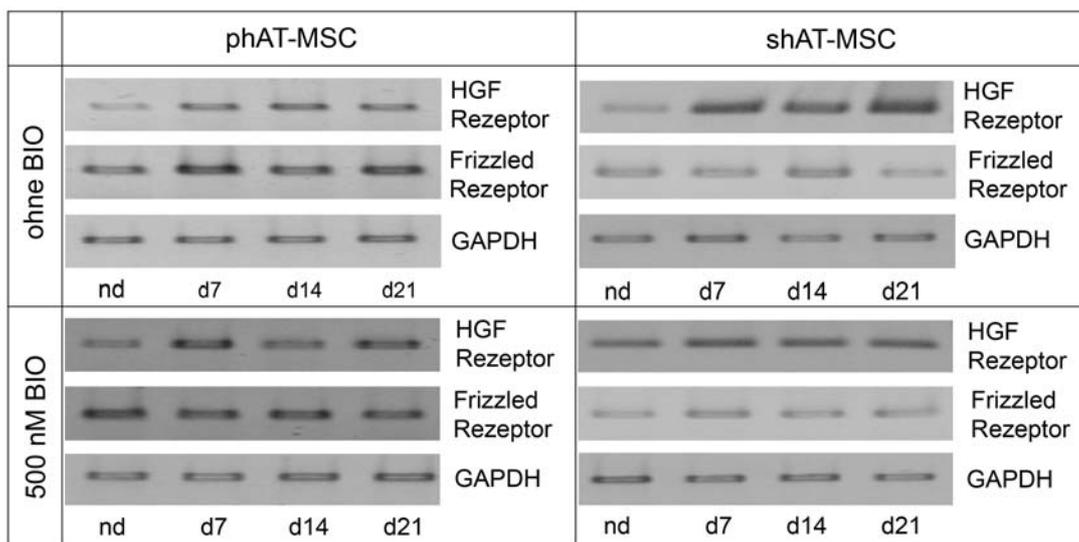


Abbildung 34: Nachweis der Expression des HGF- und des Frizzled1-Rezeptors in undifferenzierten und hepatogen differenzierten hAT-MSK mit und unter Zugabe von 500 nM BIO während der hepatogenen Differenzierung mittels semiquantitativer RT-PCR. Die konstitutiv exprimierte GAPDH diente Kontrolle der eingesetzten cDNA in den PCR-Reaktionen. Die Abbildung zeigt repräsentative Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten.

4. Diskussion:

4.1 Mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe – Eigenschaften und Vergleich

Die multiple Differenzierungsfähigkeit, die einfache Kultivierung und die Möglichkeit zur Propagierung in der Zellkultur haben mesenchymale Stammzellen (MSC) zu einer wichtigen und viel untersuchten Zellressource in der regenerativen Medizin gemacht (129, 130). In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark und dem Fettgewebe zur hepatozytären Differenzierung untersucht. Dazu musste zunächst die Identität der Ausgangszellpopulation geklärt werden.

Die FACS-Analysen zeigten eine für MSC typische Expression der Oberflächenantigene CD13, CD29, CD44, CD105 und CD166, aber die fehlende Expression der hämatopoetischen Oberflächenmarker CD14, CD34 und CD45 (39, 52). Die MSC aus dem peritonealen Fettgewebe der Ratte exprimierten ebenfalls CD29 und CD44 nicht aber CD45. Weitere Marker konnten nicht untersucht werden, da keine kommerziell erhältlichen Antikörper zur Verfügung standen. Anhand der unterschiedlichen Expression von CD44 und CD45 war es jedoch möglich, zwischen hämatopoetischen ($CD44^-$, $CD45^+$) und mesenchymalen ($CD44^+$, $CD45^-$) Stammzellen zu unterscheiden. Des Weiteren zeigte die Expression von CD29, dass die gewonnene Zellpopulation keine Epithelzellen oder Fibroblasten enthält, da diese Zellen CD29 nicht exprimieren (131). Die MSC aus humanem Knochenmark (hBM-MSC) zeigten bei allen untersuchten Oberflächenantigenen eine deutlichere Abtrennung von den korrespondierenden IgG Isotyp-Kontrollen, wohingegen die MSC aus dem Fettgewebe (hAT-MSC) eine zusätzliche Subpopulation erkennen ließen, die sich von der Hauptpopulation abtrennte (Abb. 14B). Das Auftreten von Subpopulationen nach Isolierung der hAT-MSC kann damit zusammenhängen, dass nur die hAT-MSC im Fettgewebe mit Adipozyten, Fibroblasten und epithelialen Zellen assoziiert sind, wodurch es zu einer spontanen Differenzierung dieser Zellen im Gewebe kommen kann. Dagegen sind die hBM-MSC nicht mit anderen Zellen wie epithelialen Zellen oder Fibroblasten im Gewebe assoziiert. Die gewebespezifische Vordifferenzierung von MSC, die dadurch ihr multiples Differenzierungspotential nicht verlieren, wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt (59, 132). In der

vorgelegten Untersuchung verschwanden die nachgewiesenen Subpopulationen im Verlauf der Expansionsphase. Daher kann davon ausgegangen werden, dass mit dem Beginn der Differenzierung eine homogene MSC-Population vorlag.

Durch die Adaption des Protokolls für die Differenzierung von hBM-MSC (133) auf die rAT-MSC und hAT-MSC konnte eine adipogene, osteogene und hepatogene Differenzierung durchgeführt werden. Damit ist der Nachweis der Plastizität als typische Eigenschaft von MSC erbracht. Bei der adipogenen, osteogenen und hepatogenen Differenzierung zeigten sich sowohl zwischen den phAT-MSC und shAT-MSC als auch zwischen den hAT-MSC und den hBM-MSC Unterschiede. Im Zuge der adipogenen Differenzierung zeigte sich, dass die MSC aus dem Fettgewebe sowohl schneller als auch quantitativ besser zur adipogenen Differenzierung in der Lage waren als die hBM-MSC. Umgekehrt waren die hBM-MSC schneller und anhand semiquantitativer Erhebungen zur osteogenen Differenzierung deutlicher befähigt als die hAT-MSC. Dieser Unterschied war besonders bei den hBM-MSC gegenüber den shAT-MSC ausgeprägt (Abb. 15). Man kann daher annehmen, dass MSC eine ihrem Herkunftsgewebe entsprechende gewebespezifische Vordifferenzierung aufweisen. Diese Annahme wird auch durch vergleichende Untersuchungen von hAT-MSC und hBM-MSC hinsichtlich ihres gewebetypischen Differenzierungspotentials und Expressionsprofils unterstützt (132).

4.2 Hepatogene *in vitro* Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Das Potential von MSC, sich in Hepatozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren, ist *in vitro* mit murinen MSC aus dem Knochenmark (134) und aus dem Fettgewebe (135) sowie mit humanen MSC aus dem Knochenmark (133), dem Nabelschnurblut (136) und dem Fettgewebe (120) untersucht worden. Auch die vorliegende Arbeit bestätigt die Fähigkeit von MSC aus unterschiedlichen Geweben zur hepatozytären Differenzierung. Allerdings zeigen sich auch in der hepatogenen Differenzierung gewebspezifische Unterschiede zwischen den hBM-MSC und den hAT-MSC. Während die hBM-MSC und die shAT-MSC im Zuge der Differenzierung den Hepatoblasten Vorläufermarker AFP verloren, ist dieser noch nach 21 Differenzierungstagen in den phAT-MSC nachzuweisen (Abb. 16A). AFP wird in proliferierenden Hepatozyten während der Embryogenese, in Leberzellkarzinomen und in regenerierendem Lebergewebe exprimiert. Die erhöhte AFP Expression

korreliert mit einer stärkeren Proliferation der phAT-MSK im Vergleich zu den hBM-MSK und shAT-MSK (Abb. 16B). Mit zunehmender Differenzierung wird auch das mRNA stabilisierende Protein IMP-1 in den phAT-MSK verstärkt exprimiert (Abb. 31). IMP-1 wird auch während der Embryogenese, in Karzinomen und der neuronalen Entwicklung exprimiert, ist aber im somatischen Gewebe nicht nachzuweisen (126). Zusammengefasst zeigt dies, dass die phAT-MSK während der Differenzierung zu einer starken Proliferation befähigt sind.

Gewebespezifische Unterschiede der verschiedenen MSK waren auch in der Expression von hepatogenen Markern während der Differenzierung ausgeprägt. Die cytosolische Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PCK) wurde bereits in undifferenzierten hAT-MSK, nicht aber von den undifferenzierten hBM-MSK exprimiert. Die PCK wird auch in Adipozyten exprimiert und dient hier der Bereitstellung von Glycerol für die Triglyceridsynthese und ist durch Rosiglitazone induzierbar (137). In Hepatozyten ist die PCK das Kontrollenzym in der Glukoneogenese. Die Transkription wird von den *cis*-agierenden Sequenzen CRE1 und CRE2 (cyclic AMP response elements) kontrolliert und ist durch den zweiten Botenstoff cAMP induzierbar. Während der hepatogenen Differenzierung konnte gezeigt werden, dass die durch den PCK-Promotor vermittelte *FFL*-Expression durch die Zugabe von cAMP induziert werden konnte (Ab. 11). Dies ist als klarer Hinweis auf die physiologische Regulation des PCK1-Promotors in den hepatozytär differenzierten MSK zu werten. Auch die Speicherung von Glykogen, eine für Hepatozyten typische Stoffwechsellleistung, konnte in den differenzierten MSK nachgewiesen werden (Abb. 8 und 17). Die Expression der PCK1 in undifferenzierten hAT-MSK könnte daher wie das Auftreten von Subpopulationen der isolierten MSK (s.o.) ein Hinweis auf die gewebespezifische adipozytäre Vordifferenzierung der hAT-MSK sein.

Im Zuge der hepatogenen Differenzierung waren die MSK aus Knochenmark und Fettgewebe ebenfalls in der Lage, Harnstoff zu synthetisieren, eine spezifische Funktion periportal Hepatozyten. Während in phAT-MSK und shAT-MSK maximale Syntheseraten nach 3 bzw. 7 Tagen Kultur in hepatogenem Differenzierungsmedium erreicht wurden, war dies in hBM-MSK erst nach 14-tägiger Kultur der Fall (Abb. 17). Die unterschiedlichen Harnstoffsyntheseraten korrelierten in etwa mit der Expression der CPS während der Kultur. Das Kontrollenzym des Harnstoffzyklus wurde bereits in undifferenzierten sowie zu frühen Zeitpunkten der hepatozytären Differenzierung

von hAT-MSK exprimiert. In hBM-MSK wurde die CPS erst nach 7 Tagen in hepatogenem Differenzierungsmedium exprimiert (Abb. 16). Dies lässt wiederum auf eine unterschiedliche Prägung der MSK aus unterschiedlichen Geweben schließen. In allen untersuchten MSK fiel die Harnstoffsyntheserate mit fortschreitender Kultur im Differenzierungsmedium wieder ab. Der Verlust spezifischer Funktionen in der Kultur wurde für primäre adulte Hepatozyten beschrieben (118). Dieser scheint aber weniger auf Prozessen der De-Differenzierung der Hepatozyten als vielmehr auf einer Minimierung spezifischer StoffwechsellLeistungen in Folge eines unzureichenden molekularen und zellulären Mikromilieus in der Kultur zu beruhen. Die Transplantation von wie oben beschrieben kultivierten primären Hepatozyten in eine Empfängerleber führte zur Wiederherstellung der in der *in vitro* Kultur verloren gegangenen Eigenschaften (119).

Einige hepatozytäre Marker wie z.B. CPS, CX32 oder CD26 wurden bereits in undifferenzierten hAT-MSK, nicht aber in hBM-MSK exprimiert (Abb. 16). Wie oben diskutiert, kann dies auf Unterschieden in der Prägung der MSK in unterschiedlichen Geweben beruhen. Darüber hinaus scheinen aber auch individuelle biologische Unterschiede bei den Gewebespendern wie Alter, Geschlecht oder Gewicht zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme von Bedeutung zu sein. Untersuchungen an drei verschiedenen hAT-MSK Populationen, die unter denselben Kulturbedingungen expandiert worden waren, zeigten, dass von 170 untersuchten Genen nur 66 % in allen drei Zellpopulationen gleichermaßen exprimiert wurden. Nur in zwei Populationen wurden 83 % der untersuchten Gene gleichermaßen exprimiert. Identisch exprimiert wurden vor allem Zelladhäsionsproteine, Matrixproteine und Wachstumsfaktoren (52). Daher ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Expressionen zum Teil auf individuelle Unterschiede zurückzuführen sind.

Neben den individuellen Unterschieden der Differenzierung, gibt es noch weitere Faktoren, die zu einer unterschiedlichen Genexpression führen. Die Differenzierung wird bei einer hohen Konfluenz der MSK eingeleitet, die bereits zu einer ungerichteten Differenzierung führen kann (138, 139). Zudem erfolgt ein Wechsel von dem Expansionsmedium zu dem Differenzierungsmedium. Durch eine veränderte Medienzusammensetzung kommt es zu einer Veränderung in der Genexpression von MSK (52, 56). Des Weiteren werden die MSK vor dem Wechsel zum Differenzierungsmedium mit 5'-Azacytidin behandelt. 5'-Azacytidin ist ein Ribonukleosidanalogon, das in nicht-cytotoxischen Konzentrationen

hypomethylierend auf die DNA wirkt. Dadurch werden zuvor methylierte und damit blockierte Bereiche der DNA transkribiert (140). So wird unter anderem CX43 nach der Behandlung mit 5'-Azacytidin verstärkt exprimiert (141). Grundsätzlich ist eine Differenzierung ohne die erwähnten Faktoren/Bedingungen nicht oder nur bedingt möglich.

Der Einfluß der Konfluenz war vor allem daran zu erkennen, dass die Fähigkeit der MSC zur hepatogenen Differenzierung in Bereichen auf der Kulturschale, in denen die Zellen besonders dicht wuchsen, besonders ausgeprägt war. Dies zeigte die Expression des transgenen GFP unter Kontrolle des hepatozytenspezifischen PCK1-Promotors, die zuerst in einzelnen Zellen, die immer im Bereich hoher Konfluenz lagen, zu beobachten war. Von dort ausgehend nahm die Zahl der GFP exprimierenden Zellen mit zunehmender Kulturdauer in hepatogenem Differenzierungsmedium zu. Dieser Befund war nicht auf eine ungleichmäßige Infektionseffizienz der MSC zurückzuführen, da Zellen, die GFP unter der Kontrolle des Ubiquitinpromotors exprimierten, gleichmäßig über die Kulturschalen verteilt waren (Abb. 10A, 18).

Die Fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen legen die Vermutung nahe, dass es sich nicht um eine allmähliche Zunahme der Differenzierung innerhalb der Zellen handelt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass es sich um eine Zunahme von differenzierten Zellen, ausgehend von wenigen Zellen in Bereichen hoher Konfluenz, handelt. Hypothetisch lässt sich schließen, dass die hepatogene Differenzierung von MSC Zell-Zell Kontakte sowie Zell-Matrix Kontakte voraussetzt, die in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht schwerpunktmäßig untersucht wurden.

Die hier erbrachten morphologischen, funktionellen und molekularen Befunde zeigen, dass MSC aus unterschiedlichen Geweben des Menschen und der Ratte unter definierten Kulturbedingungen zu hepatozytären Zellen differenziert werden können. Dies wird auch durch Befunde anderer Arbeitsgruppen unterstützt, die die hepatozytäre Differenzierung von MSC *in vitro* gezeigt haben (64, 120, 133, 135).

4.3 Hepatogene *in vivo* Differenzierung mesenchymaler Stammzellen

Nach Schätzungen bedarf der therapeutische Ersatz von Hepatozyten bei metabolischen Lebererkrankungen einer Repopularisierungsrate von ca. 5 % der erkrankten Lebermasse. Frühere Untersuchungen zur Integration von hepatozytär differenzierten humanen MSC in CCl₄-geschädigte Mauslebern (142) oder in

regenerierende Mauslebern nach partieller Hepatektomie (133) ergaben Repopularisierungsraten von weniger als 1 %. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Transplantation von hepatogen vordifferenzierten rAT-MSC und hAT-MSC im autologen Rattenmodell (rAT-MSC) und im xenogenen Mausmodell (hAT-MSC) in die Empfängerleber zu einer besseren Repopularisierung des Leberparenchyms führten als die Transplantation undifferenzierter MSC. Dies konnte sowohl anhand von immunhistochemischen Nachweisen der Empfängerlebern bzw. auch durch FACS-Analysen isolierter Parenchymzellen aus den Empfängerlebern gezeigt werden (Abb. 12, 13, 19, 21 und 22, sowie Tab. 8 und 9). Zwar integrierten sich auch bei Transplantationen undifferenzierter AT-MSC nach zehn Wochen vereinzelte Zellen in das Leberparenchym, jedoch lag die Repopularisierungsrate ca. 10-15-fach höher bei Transplantation von *in vitro* hepatogen vordifferenzierten MSC (Abb. 13, 23). Allerdings zeigten auch die transplantierten MSC, die zuvor nicht *in vitro* hepatozytär differenziert worden waren, zehn Wochen nach Transplantation in die Empfängerleber hepatozytenspezifische Eigenschaften wie die Expression von CD26 (Abb. 12A, B). Eine Aktivierung des PCK1-Promotors (Abb. 12E) im syngenem Rattenmodell sowie die Expression von humanem Albumin und HepPar1 (Abb. 19) zeigte sich im xenogenen Mausmodell. Anhand der GFP-Expression unter Kontrolle des Ubiquitinpromotors konnte gezeigt werden, dass es auch nicht zu einer umfangreichen Proliferation undifferenzierter MSC in der Empfängerleber kam. Die transplantierten, undifferenzierten AT-MSC sind demnach zu einer hepatogenen *in vivo* Differenzierung fähig, die allerdings nicht mit einer Proliferation dieser Zellen einhergehen. Damit scheinen undifferenzierte MSC nicht oder nur sehr begrenzt zur funktionellen Repopularisierung einer Empfängerleber befähigt. Durch die 14-tägige hepatogene *in vitro* Vorifferenzierung der MSC konnte die Repopularisierungsrate nach Transplantation im autologen Ratten- und im xenogenen Mausmodell deutlich verbessert werden.

Durch den Nachweis des typisch membranständig, kanalikulär lokalisierten CD26 sowie des GFP unter Kontrolle des PCK1-Promotors in den transplantierten rAT-MSC im autologen Rattenmodell, konnte der hepatozytäre Charakter der rAT-MSC in der Empfängerleber nachgewiesen werden (Abb.12). Die Expression von humanem HepPar1 und Albumin im xenogenen Mausmodell zeigt ebenfalls einen hohen Grad der hepatozytären Differenzierung der transplantierten hAT-MSC in der Mausleber. Deutlich konnte in Parallelschnitten gezeigt werden, dass HepPar1 und Albumin in

denselben Zellen humaner Zellverbände in der Mausleber exprimiert wurden (Abb. 19B). Ähnlich den rAT-MSC im autologen Rattenmodell exprimierten auch die hAT-MSC das transgene GFP unter der Kontrolle des PCK1-Promotors. Darüber hinaus wurde humanes Albumin in das Blut der Empfängermäuse sezerniert (Abb. 20). Die Synthese und Sekretion eines Plasmaproteins spiegelt somit eine hochspezifische hepatozytäre Funktion der humanen in die Mausleber integrierten Zellen wieder. Eine verstärkte Proliferation von nicht differenzierten hAT-MSC gegenüber den hepatozytär differenzierten, transplantierten hAT-MSC konnte auch hier nicht beobachtet werden, wie der Nachweis des GFP unter Ubiquitinpromotor-Kontrolle zeigt (Abb.12 und Abb.19). Zudem konnte in den FACS-Analysen der hepatozytär vordifferenzierten, transplantierten hAT-MSC keine Zellpopulation ermittelt werden, die das für MSC typische Oberflächenantigen CD44 exprimiert (Abb.21).

Die Verwendung undifferenzierter MSC führte auch in Modellen der Leberschädigung durch Allylalkohol (143) oder CCl₄ (120, 144) zu einer geringen Repopularisierung in den Mausempfängerlebern. Untersuchungen mit hepatozytär vordifferenzierten MSC ergaben eine deutliche Verbesserung dieser Repopularisierungsraten (135, 142).

Bei der Transplantation von vordifferenzierten hAT-MSC zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der phAT-MSC und shAT-MSC in den Empfängerlebern. Während die phAT-MSC ein eher diffuses Muster zeigten, bildeten die shAT-MSC zusammenhängende Zellverbände die sich klar vom Parenchym der Empfängerlebern abzeichneten (Abb. 19A). Auch hätte man aufgrund der höheren Proliferationsrate der phAT-MSC *in vitro* im Vergleich zu der der shAT-MSC eine höhere Repopularisierungsrate der Leber durch phAT-MSC erwarten können. Diese wurde jedoch nicht beobachtet. Eher war die Repopularisierung durch shAT-MSC höher als durch phAT-MSC (Abb. 22). Die Unterschiede im Verteilungsmuster und in der Repopularisierungsrate könnten auf unterschiedliche Expressionen von Oberflächenantigenen zurück zu führen sein. So wurde z.B. CD105 (Endoglin) auf shAT-MSC schwächer exprimiert als auf phAT-MSC (Tab. 9). Endoglin ist ein Glykoprotein des TGF β -Rezeptorkomplexes, das eine mögliche Funktion bei der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie spielt (145). Umgekehrt wurde CD166, ein Zelladhäsionsmolekül der Immunglobulin-Superfamilie, das homophile Zell-Zell Kontakte vermittelt, auf shAT-MSC stärker exprimiert als auf phAT-MSC (Tab. 9). Diese und andere Unterschiede könnten Zell-Zell Kontakte der transplantierten

Zellen untereinander aber auch zum umgebenden Leberparenchym maßgeblich beeinflussen.

Generell war der quantitative Anteil bestimmter in der vorliegenden Arbeit untersuchter Oberflächenantigene zwischen den phAT-MSC und den shAT-MSC nicht gleich. So waren nur ca. 30 % der CD29-positiven phAT-MSC zugleich positiv für CD26. Der Anteil der CD26-positiven shAT-MSC lag jedoch bei ca. 80 % (Tab. 9, Abb. 22). Dies indiziert eine Repopularisierung von hepatozytär funktionellen phAT-MSC von nur etwa 4 %, für die shAT-MSC dagegen von etwa 21 %. Im Fall der Leberregeneration im Rattenmodell lag die Repopularisierung mit rAT-MSC dagegen zwischen 12 % und 17 % der CD26-positiven Zellpopulation (Abb. 13 und Tab. 8). Des Weiteren besaßen die transplantierten hAT-MSC kein mit den Hepatozyten identisches Oberflächenexpressionsmuster, wie z.B. die Expression von CD13 oder CD166 zeigt. Bezogen auf die Expression von CD44 unterschieden sie sich aber deutlich von undifferenzierten MSC (Abb. 21). Die quantitativen und qualitativen Unterschiede der Expression von Oberflächenantigenen in den isolierten shAT-MSC und phAT-MSC aus den Empfängerlebern könnte darauf hindeuten, dass sich beide hAT-MSC Zellpopulationen *in vivo* unterschiedlich ausdifferenzieren. Der Nachweis gleicher Mengen humanen Albumins im Mausserum (Abb. 20) lässt den Schluss zu, dass der geringere Anteil hepatozytär differenzierter phAT-MSC durch eine höhere Albuminsynthese ausgeglichen wurde.

Die Transplantation der MSC erfolgte in die Rattenleber direkt über die Portalvene, bei der Transplantation in die Mausleber mittels intrasplenischer Applikation. Wie bei der Hepatozytentransplantation verteilen sich die MSC mit dem Pfortaderblutstrom in die Empfängerleber. Von der Hepatozytentransplantation ist bekannt, dass etwa 95% der transplantierten Zellen in Mikroemboli gefangen werden und nur ca. 20% davon die Endothelbarriere durchtreten. Nach 15–20 h integrieren sich die transplantierten Zellen im Wirtslebergewebe und erlangen ihre Polarität, bilden Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte untereinander und zum umgebenden Wirtsleberparenchym. Dort erlangen sie ihre spezifischen Funktionen wie z.B. die Synthese von Albumin und die Fähigkeit, Glykogen zu speichern (146). Immer jedoch erfolgt die Integration transplantierte Hepatozyten zunächst im Bereich der Portalfelder. Dies war auch nach Transplantation der hepatozytär differenzierten MSC zu beobachten (Abb. 12, 19). Dies könnte einerseits an den oben beschriebenen hämodynamischen Gegebenheiten bei der Zelltransplantation in die Leber liegen. Allerdings wäre es

auch möglich, dass der Phänotyp der *in vitro* hepatozytär vordifferenzierten MSC dem periportalen Hepatozyten gleicht, die damit eine besondere Affinität zur Integration in periportale Bereiche der Leber haben könnten. Anhand des Genexpressionsprofils der *in vitro* differenzierten hAT-MS (Abb. 16) ist zu erkennen, dass sie die PCK1 und die Carbamoylphosphat synthetase 1 (CPS) exprimieren. Des Weiteren sind sie zur Harnstoffsynthese befähigt, eine Funktion, die in periportalen und nicht in perivenösen Hepatozyten ausgeprägt ist. Umgekehrt exprimieren sie nicht die Glutaminsynthetase (GS), die wiederum nur in perivenösen Hepatozyten zu finden ist (147, 148). Die Zonierung von Stoffwechsellleistungen im Leberparenchym ist wahrscheinlich abhängig von der Menge des kernständigen β -Catenins, das unter anderem über den APC-Gehalt reguliert wird (148). APC wird in periportalen Hepatozyten hoch, in perivenösen nur gering exprimiert. Dadurch ist der Komplex aus Axin, APC, GSK3 β und CK1 α in perivenösen Hepatozyten destabilisiert, was mit der verminderten Phosphorylierung und Translokation des β -Catenins in den Zellkern einhergeht. Da die GS als Zielgen des Wnt/ β -Catenin Signalweges unter Kontrolle eines TCF/Lef-Bindemotives steht, kommt es nur in perivenösen Hepatozyten zu einer Expression der GS (104, 106). Diese Situation ließ sich auch in den hepatozytär differenzierten MSC experimentell durch die Behandlung der Zellen mit dem GSK3 β Hemmstoff BIO während der hepatozytären Differenzierung nachahmen.

4.4 Beteiligung des Wnt/ β -Catenin Signalwegs an der hepatogenen Differenzierung von hAT-MS

Unter dem verwendeten Protokoll ließen sich hAT-MS hepatogen differenzieren, wobei es zu einer spontanen Ausprägung des periportalen Phänotyps kam. Die Differenzierung von hAT-MS war von den Wachstumsfaktoren EGF und HGF abhängig, da durch das Fehlen der Wachstumsfaktoren nicht nur die Proliferation der Zellen stark eingeschränkt war (Abb. 23), sondern die Zellen zudem keinen Harnstoff synthetisierten (Abb. 23) und nur wenig PCK exprimierten (Abb. 24). Die fehlende Expression von CD26 und Albumin lässt ebenfalls darauf schließen, dass es zu keiner funktionellen hepatozytären Differenzierung kam. Die Zugabe von Wachstumsfaktoren und die damit verbundene Aktivierung spezifischer Gene erwiesen sich als für die hepatogene Differenzierung als essentiell.

Durch Untersuchungen an hBM-MSC im Zuge der osteogenen Differenzierung ist der Einfluss des Wnt-Signalweges auf die Differenzierung von Stammzellen nachgewiesen worden (92-94). Daher wurde der Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalweges während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC mit den Wachstumsfaktoren EGF und HGF überprüft. Bisher lagen keine Untersuchungen zum Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalweges auf die hepatogene Differenzierung von hAT-MSC vor. Daher musste zunächst überprüft werden, ob es einen Zusammenhang zwischen der hepatogenen Differenzierung und Expressionsunterschieden und/oder der zellulären Umverteilung des β -Catenins gibt. Immunocytochemische Färbungen und *Western Blot*-Analysen zeigten, dass es auch bei den hAT-MSC während der hepatogenen Differenzierung zu einer Translokation des β -Catenins in den Zellkern kommt (Abb. 26). Obwohl die Menge des Gesamt- β -Catenins variierte, nahm mit fortschreitender Differenzierung die Menge des phosphorylierten β -Catenin ab. Da die Ser^{33, 37, 45} und Tyr⁴¹ phosphorylierte Form des β -Catenins via Proteasom abgebaut wird (78), gelangt nur das nicht phosphorylierte und das Tyr^{654, 670} phosphorylierte β -Catenin in den Zellkern (101) und aktiviert dort die TCF/Lef vermittelte Transkription von Wnt-Zielgenen. Die konfokal-mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 26) zeigen, dass das β -Catenin im Zellkern lokalisiert ist. Es war jedoch nicht ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Bei dem cytosolischen β -Catenin handelt es sich vermutlich zum einen um membranständiges β -Catenin, welches in Bereichen der Zell-Zellkontakte zusammen mit E-Cadherin assoziiert vorkommt und um β -Catenin, welches zusammen mit APC, Axin und der GSK3 β im Enzymkomplex assoziiert ist. Die Bereiche des cytosolischen β -Catenins sind in gut erkennbaren Kompartimenten lokalisiert, die sich in der Nähe des Zellkerns befinden. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in Abb. 28 zeigen, dass die GSK3 β und die Ser⁹ phosphorylierte GSK3 β in subzellulär ähnlichen (gleichen?) Kompartimenten assoziiert sind. Dies deutet darauf hin, dass das cytosolische β -Catenin während der Differenzierung teilweise mit der GSK3 β assoziiert ist. Diese β -Catenin assoziierten Kompartimente waren nach zwei Wochen der hepatogenen Differenzierung kaum noch zu erkennen, was mit der Abnahme des phosphorylierten β -Catenins korreliert. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Wnt/ β -Catenin Signalweg in die hepatogene Differenzierung von hAT-MSC involviert ist, da die zunehmende Kerntranslokation des β -Catenins bei

gleichzeitiger Abnahme des phosphorylierten β -Catenins auf den kanonischen Wnt-Signalweg zurückzuführen ist.

4.5 Einfluss des β -Catenins auf den Phänotyp hepatogen differenzierter hAT-MSC

Die GSK3 β spielt eine zentrale Rolle im Wnt/ β -Catenin Signalweg. Falls es einen Einfluss des Wnt/ β -Catenin Signalweges auf die hepatogene Differenzierung gibt, sollte es durch die Zugabe des GSK3 β Inhibitor (2-Z, 3-E)-6-bromoindirubin-3-oxime (BIO) (123) zu einer verstärkten Transkription von Wnt-Zielgenen kommen. Die Zugabe von BIO führte zu einer verstärkten Kerntranslokation des β -Catenins (Abb. 27). Während es zu einer gleichmäßigen Verteilung des β -Catenins in den nicht differenzierten hAT-MSC ohne BIO-Zusatz kam, war es in den mit BIO behandelten, nicht differenzierten hAT-MSC bereits auch im Kern lokalisiert. Die Gesamtmenge des β -Catenins änderte sich durch die BIO-Behandlung kaum (Abb. 26 und 27). Cytosolisches phosphoryliertes β -Catenin war in den mit BIO behandelten hAT-MSC jedoch kaum noch nachweisbar. Hierbei handelte es sich um durch die GSK3 β phosphoryliertes β -Catenin, da die c-met Phosphorylierungen des β -Catenins an den Positionen Tyr⁶⁵⁴ und Tyr⁶⁷⁰ von dem Antikörper nicht erkannt wurden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen und die *Western Blot*-Analysen der GSK3 β (Abb. 28) zeigen, dass die Menge der Ser⁹ phosphorylierten GSK3 β in den hAT-MSC ohne BIO geringer ist als in den BIO behandelten hAT-MSC. In den shAT-MSC kommt es während der Differenzierung ohne BIO-Zugabe zu einer stetigen Abnahme der Ser⁹ phosphorylierten GSK3 β , die mit der Abnahme des Phospho- β -Catenins korreliert. In den phAT-MSC dagegen kommt es über den gleichen Zeitraum zu einer Zunahme der Ser⁹ phosphorylierten GSK3 β . Da die Menge an Phospho- β -Catenin jedoch abnimmt, ist es möglich, dass die Ser⁹ Phosphorylierung nicht auf die BIO-Inhibierung zurückzuführen ist, sondern direkt von Substraten des MAPK-Kinase Signalweges übertragen wurde. Die Zunahme der an Ser⁹ phosphorylierten GSK3 β und die verstärkte Kerntranslokation des β -Catenins zeigt, dass es möglich ist, den Wnt/ β -Catenin Signalweg während der hepatogenen Differenzierung derart zu beeinflussen, dass es zu einer verstärkten Kerntranslokation des β -Catenins kommt. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Hemmung der GSK3 β , die in vielen Signalwegen und Syntheseprozessen eine zentrale Rolle einnimmt (108), unspezifische pleiotrope

Wirkungen erzeugt. Solche können hier aber zumindest teilweise ausgeschlossen werden, da die Expression von Wnt-unabhängigen Zielgenen in Gegenwart von BIO nicht beeinflusst wurde (Abb. 33, 34). Daher geht also die hepatogene Differenzierung von hAT-MSC mit der Aktivierung der GSK3 β , der dadurch vermittelten Stabilisierung und nukleären Translokation des β -Catenin und der Induktion der TCF4/Lef1-vermittelten Genexpression (Abb. 29) einher. Dies deutet auf die Beteiligung des kanonischen Wnt/ β -Catenin Signalweges während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC hin.

In den phAT-MSC war dies allerdings an den Tagen 7, 14 und 28 nicht zu beobachten. Dies war vermutlich auf die Limitierung von TCF4 zurückzuführen, wie die geringeren Proteinmengen an diesen Tagen zeigen (Abb. 30). Auch in den shAT-MSC korrelierte die verminderte Menge an TCF4 an den Tagen 10 und 21 der Kultur mit einer verminderten, durch BIO stimulierbaren TCF4/Lef1-abhängigen Expression der *FFL*. Dies zeigt, dass während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC neben der Kerntranslokation von β -Catenin eine Regulation der Genexpression durch andere Mechanismen bedeutsam ist. Da die Expression der *FFL* unter der Kontrolle eines TCF4/Lef1 Bindemotives steht, war zu vermuten, dass TCF4 während der hepatogenen Differenzierung in den hAT-MSC für die beobachtete Regulation verantwortlich war (Abb. 30)

Die Expression von Lef1 (Abb. 31) blieb während der Differenzierung nahezu konstant, wurde aber durch die BIO-Behandlung erhöht. Die verstärkte Lef1 Expression nach BIO-Behandlung ist wahrscheinlich eine Folge der verstärkten Kerntranslokation des β -Catenins, da die Transkription von Lef1 durch Kernständiges β -Catenin erhöht wird (149). Die Zunahme der Lef-1 Expression durch die Behandlung mit BIO zusammen mit der verstärkten Kerntranslokation des β -Catenins erklärt die verstärkte *FFL*-Expression nach der Behandlung mit BIO.

Durch die Behandlung mit BIO konnte auch die Expression des Wnt-Zielgens CyclinD1 (127) erhöht werden, nicht aber die Expression des Wnt-Zielgens IMP-1. Es ist zu vermuten, dass an der Transkription von IMP-1 noch andere Transkriptionsfaktoren beteiligt sind, die jedoch nicht reguliert wurden. Die Kerntranslokation des β -Catenins muss nicht zwangsläufig zu einer unmittelbaren Transkription von Genen, die unter dem TCF/Lef-Bindemotiv stehen, kommen. Durch die C-terminale Domäne des Lef-1 (Abb. 6) kann es nach Bindung von TCF-3 und TCF-4 auch zu einer verstärkten Repression von Wnt-Zielgenen nach Interaktion mit

C-terminalen Bindeprotein (CtBP) kommen (88). Zudem besitzt Lef-1 eine Kontext-abhängige Aktivierungsdomäne, was an Untersuchungen des *T-cell receptor alpha* (TCR α) gezeigt werden konnte (89). Über diese Domäne interagiert Lef-1 mit dem Cofaktor ALY, der durch seine Bindung an den Transkriptionsfaktor *acute myeloid leukemia factor-1* (AML-1) die Transkriptionsaktivierung am TCR α Enhancer vermittelt. Neben den Proteinen der TCF/LEF-Familie können auch andere Transkriptionsfaktoren an β -Catenin binden, wie die Histon Acetylase CBP/p300 und der SW1/SNF Komplex, die das Chromatin um die TCF Bindestelle reorganisieren (90). Wenn der *pituitary specific homeodomain factor* (prop1) an β -Catenin bindet, so kann dieser Komplex sowohl als Aktivator oder auch als Repressor der Transkription dienen. Welche Funktion dieser Komplex ausübt hängt von der Bindung des Co-Repressors Groucho ab (124).

Denkbar wäre ebenso eine vermehrte β -TrCP Expression, da β -TrCP auch unter Kontrolle eines TCF/Lef-Bindemotivs steht (150). Die mRNA des β -TrCP wird durch IMP-1 stabilisiert (151), was zu einem Anstieg der E3 Untereinheit der Ubiquitin-Ligase führt. Dadurch kommt es zu einem verstärkten Abbau des β -Catenins, was zu einer verminderten Transkription von Wnt-Zielgenen führt. Dadurch wiederum kommt es zu einer verstärkten Phosphorylierung und dem Abbau des β -Catenins. Die Expression von Wnt-Zielgenen müsste als Folge einer solchen Signalkaskade nachlassen. Dieser negative Rückkopplungsmechanismus könnte den Wnt- β -Catenin Signalweg kontrollieren (Abb 35).

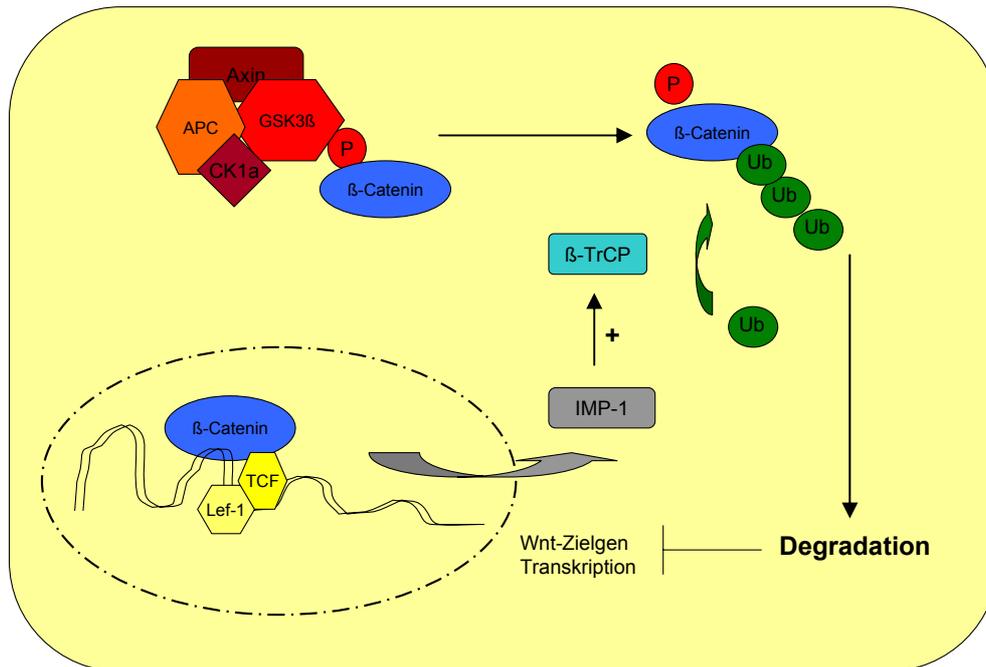


Abbildung 35: Postulierter Mechanismus der negativen Regulation der Expression von Wnt-Zielgenen nach verstärkter Kerntranslokation von β -Catenin. Durch die verstärkte Expression von IMP-1 nach Aktivierung des Wnt/ β -Catenin Signalweges kommt es durch die mRNA Stabilisierung des β -TrCP zu einer Zunahme der E3 Ubiquitinligase. Dies führt zu einem verstärkten Abbau des β -Catenins und einem Transkriptionsrückgang von Wnt-Zielgenen.

Die Zunahme des Phospho- β -Catenins in mit BIO behandelten pHAT-MSC ist damit ebenso wie die verringerte Expression der Wnt-Zielgene CyclinD1 und IMP-1 am Ende der Differenzierung erklärbar (Abb 31). Da sowohl die mit BIO behandelten, als auch die nicht behandelten hAT-MSC eine verringerte Expression zeigen, könnte diese Regulation auch, weniger stark ausgeprägt, unabhängig von der BIO-Behandlung ablaufen.

Die Wirkung von BIO zeigt, dass die Kerntranslokation des β -Catenins einen Einfluss auf die Differenzierung hat, indem die hAT-MSC durch den Einfluss von BIO einen perivenösen Phänotyp ausbilden. Durch die verstärkte Kernlokalisierung des β -Catenins kommt es zu einer erhöhten Expression von Wnt-Zielgenen, zu denen auch die GS gehört (Abb. 32). Im Gegensatz dazu exprimieren die nicht behandelten hAT-MSC keine GS, dafür aber APC. Dies führt zu einer Stabilisierung des Multiproteinkomplexes APC, Axin, GSK3 β und CK1 α und damit zu einem verstärkten Abbau des β -Catenins via Proteasom. Als Konsequenz daraus wird der periportale

Phänotyp stärker ausgeprägt, was mit einer verstärkten PCK-Expression einhergeht und auf die β -Catenin abhängige Ausprägung des Phänotypes von Hepatozyten hindeutet (148). Durch die Behandlung der hAT-MSK mit BIO konnte keine Veränderung auf die hepatogene Differenzierung hinsichtlich der Wnt-unabhängigen Zielgene CD26 und CX32 beobachtet werden. Die hAT-MSK zeigten eine stetige Zunahme von CD26, die Expression von CX32 war jedoch nur marginal nachweisbar (Abb. 33). Durch die unveränderte Expression des HGF-Rezeptors (Abb. 34) der mit BIO behandelten hAT-MSK gegenüber den nicht behandelten hAT-MSK kommt es in der Expression von essentiellen Rezeptoren während der hepatogenen Differenzierung zu keiner Veränderung.

Aus den Befunden kann man den Schluss ziehen, dass der Übergang von undifferenzierten zu hepatozytär differenzierten hAT-MSK die Verminderung der β -Catenin vermittelten Genaktivierung erfordert. Jedoch scheint die vermehrte Kerntranslokation des β -Catenins wichtige Mechanismen im Differenzierungsprozess zu steuern, die für die spezifische Ausbildung hepatozytärer Eigenschaften erforderlich sind. Die hier verwendeten Differenzierungsbedingungen scheinen die Ausbildung von Eigenschaften periportal Hepatozyten zu begünstigen, die jedoch durch die Aktivierung Wnt-Zielgenen durch BIO-Behandlung in perivenöse Eigenschaften umgewandelt werden können. Diese Schlussfolgerung ist konsistent mit der Rolle des β -Catenins bei der Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters (92-95) und der bei der Proliferation und Differenzierung adulter Hepatozyten während der Leberregeneration (101).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit konnte die Isolation von mesenchymalen Stammzellen aus humanem Knochenmark sowie aus humanem und murinem Fettgewebe etabliert werden. Die gewonnenen mesenchymalen Stammzellen zeigten das für MSC typische Expressionsmuster von Oberflächenantigenen. Alle mesenchymale Stammzellen wiesen eine einheitlich fibroblastenähnliche Morphologie mit der Fähigkeit zur Koloniebildung auf. Anhand der multiplen Differenzierung der Stammzellen in adipogene, osteogene und hepatogene Zellen konnte der Nachweis ihrer Plastizität durch die Detektion spezifischer Stoffwechselmetabolite sowie durch die Analyse der Genexpression mittels semiquantitativer RT-PCR erbracht werden. So konnte gezeigt werden, dass die Expression von Vorläufergenen im Zuge der Differenzierung abnahm und die Expression gewebsspezifischer Gene zunahm. In hepatozytär differenzierten MSC wurden leberspezifische Promotoren aktiviert, was ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl hepatozytenspezifischer Transkriptionsfaktoren voraussetzt. Mesenchymale Stammzellen, die aus unterschiedlichen Geweben isoliert wurden, zeigten generell ein einheitliches Differenzierungspotential. Die Ausprägung verschiedener Genexpressionsmuster, der Stoffwechselleistungen und das Proliferationsverhalten wiesen graduelle Unterschiede auf, die auf eine gewebsspezifische Präkonditionierung hindeuten.

Im syngenem Transplantationsmodell der Ratte repopularisierten *in vitro* hepatozytär vordifferenzierte MSC die Empfängerleber in großem Umfang und bildeten hepatozytär funktionelle Zellverbände. Undifferenzierte MSC hingegen integrierten nur vereinzelt in das Leberparenchym, differenzierten sich allerdings im Empfängergewebe ebenfalls zu Zellen mit hepatozytären Eigenschaften aus.

Diese Befunde konnten im xenogenen Transplantationsmodell, bei dem humane MSC aus peritonealem und subkutanem Fettgewebe in Lebern immundefizienter Mäuse transplantiert wurden, bestätigt werden. Durchflußzytometrische und immunhistochemische Analysen der Empfängerlebern ergaben, dass etwa zehnmal mehr Zellen integrierten, wenn diese hepatozytär vordifferenziert worden waren.

Das Expressionsmuster von Oberflächenantigenen der isolierten MSC unterschied sich zwar von dem adulter humaner Hepatozyten, aber es kam auch zu einem Verlust von mesenchymalen Oberflächenantigenen. Dies zeigt, dass die transplantierten MSC nur zu einem gewissen Grad einen hepatozytären Phänotyp

annahmen, was möglicherweise auf unzureichende Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Interaktionen der humanen Zellen im murinen Gewebshintergrund zurückzuführen ist. Durch die Sekretion humanen Albumins in das Mausserum, sowie anhand des Nachweises von humanen hepatozytenspezifischen Proteinen konnte die hepatozytäre Funktionalität der transplantierten MSC gezeigt werden.

Die periportalen und perivenösen Phänotypen repräsentieren die Zonierung des Leberparenchyms in metabolisch unterschiedliche Hepatozyten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während der hepatogenen Differenzierung von hAT-MSC zu einer Kerntranslokation von β -Catenin und einer damit verbundenen Ausprägung des periportal Phänotyps kommt. Durch die spezifische Inhibierung der zentralen Komponente GSK3 β konnte eine verstärkte Kerntranslokation des β -Catenins erreicht werden. Dies hatte die Aktivierung von Genen zur Folge, die zu einer Veränderung „in Richtung“ perivenösen Phänotyps der MSC während der hepatogenen Differenzierung führte. Neben der Änderung des Phänotyps führte die Inhibierung der GSK3 β auch zu einer verstärkten Expression von Genen, die unter anderem auch während der Leberregeneration verstärkt exprimiert werden. Dabei wurde die hepatozytäre Funktionalität der differenzierten MSC nicht beeinträchtigt.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch die Verwendung hepatozytär vordifferenzierter MSC eine bessere Repopularisationsrate erzielt werden kann, als mit undifferenzierten MSC. Durch den Einsatz körpereigener Stammzellen aus dem Fettgewebe wird eine Immunantwort umgangen, was deren Nutzung als Alternative zur Organtransplantation nahelegt. Durch eine gezielte Veränderung der MSC während der hepatogenen Differenzierung kann der Phänotyp der zu transplantierenden MSC derart beeinflusst werden, dass entsprechend der Lebererkrankung gezielt periportal oder perivenös hepatogen differenzierte MSC transplantiert werden könnten. Dadurch könnte bei Lebererkrankungen unterschiedlicher Ätiologie sowohl periportales als auch perivenöses Leberparenchym selektiv regeneriert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Farber E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956;16:142-148.
2. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-1487.
3. Jungermann K, Kietzmann T. Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver. *Hepatology* 2000;31:255-260.
4. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and non-parenchymal metabolism in liver. *Annu Rev Nutr* 1996;16:179-203.
5. Jungermann K. Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 1995;103:81-91.
6. Strassburg CP, Vogel A, Manns MP. Autoimmunity and hepatitis C. *Autoimmun Rev* 2003;2:322-331.
7. Zhu AX. Hepatocellular carcinoma: are we making progress? *Cancer Invest* 2003;21:418-428.
8. Soemohardjo S. New options in the treatment of chronic hepatitis. *Adv Exp Med Biol* 2003;531:191-198.
9. Ballas CB, Zielske SP, Gerson SL. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *J Cell Biochem Suppl* 2002;38:20-28.
10. Gill RQ, Sterling RK. Acute liver failure. *J Clin Gastroenterol* 2001;33:191-198.
11. Muller P, Aurich H, Wenkel R, Schaffner I, Wolff I, Walldorf J, Fleig WE, et al. Serum-free cryopreservation of porcine hepatocytes. *Cell Tissue Res* 2004;317:45-56.
12. David P, Alexandre E, Audet M, Chenard-Neu MP, Wolf P, Jaeck D, Azimzadeh A, et al. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats (NAR). *Cell Transplant* 2001;10:67-80.
13. Runge D, Michalopoulos GK, Strom SC, Runge DM. Recent advances in human hepatocyte culture systems. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:1-3.
14. Schneider C, Aurich H, Wenkel R, Christ B. Propagation and functional characterization of serum-free cultured porcine hepatocytes for downstream applications. *Cell Tissue Res* 2006;323:433-442.
15. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
16. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-1530.
17. Palermo AT, Labarge MA, Doyonnas R, Pomerantz J, Blau HM. Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol* 2005;279:336-344.
18. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000;290:1775-1779.
19. Zeng Z, Yuan X, Liu G, Zeng X, Ng H, Chen H, Jiang T, et al. Manipulation of proliferation and differentiation of human bone marrow-derived neural stem cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 2007;85:310-320.
20. Poulosom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarajah S, Jeffery R, et al. Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 2001;195:229-235.
21. van Haaften T, Thebaud B. Adult bone marrow-derived stem cells for the lung: implications for pediatric lung diseases. *Pediatr Res* 2006;59:94R-99R.

22. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
23. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
24. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.
25. Fujino H, Hiramatsu H, Tsuchiya A, Niwa A, Noma H, Shiota M, Umeda K, et al. Human cord blood CD34+ cells develop into hepatocytes in the livers of NOD/SCID/ γ cnul mice through cell fusion. *Faseb J* 2007.
26. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-904.
27. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968-973.
28. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-247.
29. Weber C, Gokorsch S, Czermak P. Expansion and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs* 2007;30:611-618.
30. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.
31. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-488.
32. Bieback K, Kern S, Kluter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 2004;22:625-634.
33. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004;6:543-553.
34. Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005;23:1012-1020.
35. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19:1450-1456.
36. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-2402.
37. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
38. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 1999;107:275-281.
39. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.

40. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-317.
41. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769-778.
42. Song X, Zhu CH, Doan C, Xie T. Germline stem cells anchored by adherens junctions in the Drosophila ovary niches. *Science* 2002;296:1855-1857.
43. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006;12:5834-5845.
44. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-415.
45. De Ugarte DA, Alfonso Z, Zuk PA, Elbarbary A, Zhu M, Ashjian P, Benhaim P, et al. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunol Lett* 2003;89:267-270.
46. Silva WA, Jr., Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2003;21:661-669.
47. Aust L, Devlin B, Foster SJ, Halvorsen YD, Hicok K, du Laney T, Sen A, et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 2004;6:7-14.
48. Panepucci RA, Siufi JL, Silva WA, Jr., Proto-Siquiera R, Neder L, Orellana M, Rocha V, et al. Comparison of gene expression of umbilical cord vein and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2004;22:1263-1278.
49. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9-20.
50. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:258-264.
51. Lee MW, Choi J, Yang MS, Moon YJ, Park JS, Kim HC, Kim YJ. Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:273-278.
52. Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H, Ogle RC. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells* 2005;23:412-423.
53. Parekkadan B, Sethu P, Van Poll D, Yarmush ML, Toner M. Osmotic Selection of Human Mesenchymal Stem/Progenitor Cells from Umbilical Cord Blood. *Tissue Eng* 2007.
54. Jager M, Krauspe R. Antigen expression of cord blood derived stem cells under osteogenic stimulation in vitro. *Cell Biol Int* 2007;31:950-957.
55. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327:449-462.
56. Lee RH, Kim B, Choi I, Kim H, Choi HS, Suh K, Bae YC, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004;14:311-324.

57. Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, Kawaguchi H, et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;332:297-303.
 58. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, et al. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem* 2007;101:135-146.
 59. Schilling T, Kuffner R, Klein-Hitpass L, Zimmer R, Jakob F, Schutze N. Microarray analyses of transdifferentiated mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2008;103:413-433.
 60. Schilling T, Noth U, Klein-Hitpass L, Jakob F, Schutze N. Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2007;271:1-17.
 61. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *Apmis* 2005;113:831-844.
 62. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Walldorf J, et al. Functional integration of human mesenchymal stem cell-derived hepatocytes into mouse livers. *Gut* 2006.
 63. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40:1275-1284.
 64. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: Differentiation into hepatic lineage. *Toxicology in Vitro*
- In Vitro Cytotoxicity Mechanisms. Proceedings of the 46th ETCS International Meeting and the 3rd International Joint Meeting of AICC and CELLTOX 2007;21:324-329.
65. Lange C, Mix E, Rateitschak K, Rolfs A. Wnt signal pathways and neural stem cell differentiation. *Neurodegener Dis* 2006;3:76-86.
 66. Prakash N, Wurst W. A Wnt signal regulates stem cell fate and differentiation in vivo. *Neurodegener Dis* 2007;4:333-338.
 67. Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, Zhao RC. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83-88.
 68. Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E, Renner P, Lang SA, Stoeltzing O, Geissler EK, et al. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 2007;25:639-645.
 69. Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:3431-3440.
 70. Chamberlain J, Yamagami T, Colletti E, Theise ND, Desai J, Frias A, Pixley J, et al. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep. *Hepatology* 2007.
 71. Witek RP, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant* 2005;14:41-47.
 72. Fang B, Shi M, Liao L, Yang S, Liu Y, C. ZR. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation* 2004;78:83-88.
 73. Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:3431-3440.

74. Riggelman B, Schedl P, Wieschaus E. Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is posttranscriptionally regulated by *wingless*. *Cell* 1990;63:549-560.
75. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59-88.
76. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
77. Huelsken J, Vogel R, Erdmann B, Cotsarelis G, Birchmeier W. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell* 2001;105:533-545.
78. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281:22429-22433.
79. Chen W, ten Berge D, Brown J, Ahn S, Hu LA, Miller WE, Caron MG, et al. Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* 2003;301:1391-1394.
80. Wong HC, Bourdelas A, Krauss A, Lee HJ, Shao Y, Wu D, Mlodzik M, et al. Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* 2003;12:1251-1260.
81. Sun TQ, Lu B, Feng JJ, Reinhard C, Jan YN, Fantl WJ, Williams LT. PAR-1 is a Dishevelled-associated kinase and a positive regulator of Wnt signalling. *Nat Cell Biol* 2001;3:628-636.
82. Mao J, Wang J, Liu B, Pan W, Farr GH, 3rd, Flynn C, Yuan H, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol Cell* 2001;7:801-809.
83. Takahashi M, Deb NJ, Kawashita Y, Lee SW, Furgueil J, Okuyama T, Roy-Chowdhury N, et al. A novel strategy for in vivo expansion of transplanted hepatocytes using preparative hepatic irradiation and FasL-induced hepatocellular apoptosis. *Gene Therapy* 2003;10:304-313.
84. Tetsu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999;398:422-426.
85. Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K. pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature* 1997;385:829-833.
86. van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, et al. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene *dTCF*. *Cell* 1997;88:789-799.
87. Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 1994;10:94-100.
88. Brannon M, Brown JD, Bates R, Kimelman D, Moon RT. XTCBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 1999;126:3159-3170.
89. Bruhn L, Munnerlyn A, Grosschedl R. ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev* 1997;11:640-653.
90. Hecht A, Vleminckx K, Stemmler MP, van Roy F, Kemler R. The p300/CBP acetyltransferases function as transcriptional coactivators of beta-catenin in vertebrates. *Embo J* 2000;19:1839-1850.
91. Trowbridge JJ, Moon RT, Bhatia M. Hematopoietic stem cell biology: too much of a Wnt thing. *Nat Immunol* 2006;7:1021-1023.

92. Scheller M, Huelsken J, Rosenbauer F, Taketo MM, Birchmeier W, Tenen DG, Leutz A. Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat Immunol* 2006;7:1037-1047.
93. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol* 2006;7:1048-1056.
94. Baksh D, Tuan RS. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2007;212:817-826.
95. Baksh D, Boland GM, Tuan RS. Cross-talk between Wnt signaling pathways in human mesenchymal stem cells leads to functional antagonism during osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 2007;101:1109-1124.
96. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 2001;61:6050-6054.
97. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-1512.
98. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J Biol Chem* 2002;277:33398-33410.
99. Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *Embo J* 1989;8:1711-1717.
100. Roura S, Miravet S, Piedra J, Garcia de Herreros A, Dunach M. Regulation of E-cadherin/Catenin association by tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1999;274:36734-36740.
101. Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology* 2007;45:1298-1305.
102. Monga SP, Mars WM, Pediaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, Wang X, et al. Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 2002;62:2064-2071.
103. Benhamouche S, Decaens T, Godard C, Chambrey R, Rickman DS, Moinard C, Vasseur-Cognet M, et al. Apc tumor suppressor gene is the "zonation-keeper" of mouse liver. *Dev Cell* 2006;10:759-770.
104. Sekine S, Lan BY, Bedolli M, Feng S, Hebrok M. Liver-specific loss of beta-catenin blocks glutamine synthesis pathway activity and cytochrome p450 expression in mice. *Hepatology* 2006;43:817-825.
105. Tan X, Behari J, Cieply B, Michalopoulos GK, Monga SP. Conditional deletion of beta-catenin reveals its role in liver growth and regeneration. *Gastroenterology* 2006;131:1561-1572.
106. Cadoret A, Ovejero C, Terris B, Souil E, Levy L, Lamers WH, Kitajewski J, et al. New targets of beta-catenin signaling in the liver are involved in the glutamine metabolism. *Oncogene* 2002;21:8293-8301.
107. Embi N, Rylatt DB, Cohen P. Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 1980;107:519-527.
108. Frame S, Cohen P. GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem J* 2001;359:1-16.

109. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 1995;378:785-789.
110. Shaw M, Cohen P. Role of protein kinase B and the MAP kinase cascade in mediating the EGF-dependent inhibition of glycogen synthase kinase 3 in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett* 1999;461:120-124.
111. Yamamoto H, Kishida S, Kishida M, Ikeda S, Takada S, Kikuchi A. Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability. *J Biol Chem* 1999;274:10681-10684.
112. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996;272:1023-1026.
113. Ding VW, Chen RH, McCormick F. Differential regulation of glycogen synthase kinase 3beta by insulin and Wnt signaling. *J Biol Chem* 2000;275:32475-32481.
114. Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S. Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Prolif* 2004;37:1-21.
115. Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration
10.1073/pnas.252570299. *PNAS* 2002;99:16881-16886.
116. Chakravarty K, Cassuto H, Reshef L, Hanson RW. Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2005;40:129-154.
117. Rucktaschel AK, Granner DK, Christ B. Regulation by glucagon (cAMP) and insulin of the promoter of the human phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (cytosolic) in cultured rat hepatocytes and in human hepatoblastoma cells. *Biochem J* 2000;352:211-217.
118. Schneider C, Aurich H, Wenkel R, Christ B. Propagation and functional characterization of serum-free cultured porcine hepatocytes for downstream applications. *Cell and Tissue Research* 2006;323:433-442.
119. Aurich H, König S, Schneider C, Walldorf J, Krause P, Fleig WE, Christ B. Functional characterization of serum-free cultured rat hepatocytes for downstream transplantation applications. *Cell Transplantation* 2005;14:497-506.
120. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:258-264.
121. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267-274.
122. Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, Kim JH, Bae YC, Ba B, Jung JS. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng* 2006;12:111-121.
123. Sinha D, Wang Z, Ruchalski KL, Levine JS, Krishnan S, Lieberthal W, Schwartz JH, et al. Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;288:F703-713.
124. Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Kronen A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, et al. Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. *Cell* 2006;125:593-605.
125. Veeman MT, Slusarski DC, Kaykas A, Louie SH, Moon RT. Zebrafish prickles, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* 2003;13:680-685.

126. Huttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, et al. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 2005;438:512-515.
127. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5522-5527.
128. Albrecht JH, Hu MY, Cerra FB. Distinct patterns of cyclin D1 regulation in models of liver regeneration and human liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:648-655.
129. Kassem M, Kristiansen M, Abdallah BM. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004;95:209-214.
130. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 2006;5:91-116.
131. Balzac F, Belkin AM, Koteliansky VE, Balabanov YV, Altruda F, Silengo L, Tarone G. Expression and functional analysis of a cytoplasmic domain variant of the beta 1 integrin subunit. *J Cell Biol* 1993;121:171-178.
132. Noel D, Caton D, Roche S, Bony C, Lehmann S, Casteilla L, Jorgensen C, et al. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008;314:1575-1584.
133. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-415.
134. Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005;37:276-279.
135. Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, Konig S, Dollinger MM, Fleig WE, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Experimental Cell Research* 2007;313:2875-2886.
136. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-1675.
137. Duplus E, Benelli C, Reis AF, Fouque F, Velho G, Forest C. Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene in human adipose tissue: induction by rosiglitazone and genetic analyses of the adipocyte-specific region of the promoter in type 2 diabetes. *Biochimie* 2003;85:1257-1264.
138. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation 10.1158/0008-5472.CAN-04-4194. *Cancer Res* 2005;65:3035-3039.
139. Naruse K, Urabe K, Mukaida T, Ueno T, Migishima F, Oikawa A, Mikuni-Takagaki Y, et al. Spontaneous differentiation of mesenchymal stem cells obtained from fetal rat circulation. *Bone* 2004;35:850-858.
140. Cedar H, Razin A. DNA methylation and development. *Biochim Biophys Acta* 1990;1049:1-8.
141. Burlacu A, Rosca AM, Maniu H, Titorencu I, Dragan E, Jinga V, Simionescu M. Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *Eur J Cell Biol* 2008;87:173-184.
142. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 2007;46:219-228.
143. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-763.

144. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, Park HK, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:1153-1161.
145. Sanz-Rodriguez F, Guerrero-Esteo M, Botella LM, Banville D, Vary CP, Bernabeu C. Endoglin regulates cytoskeletal organization through binding to ZRP-1, a member of the Lim family of proteins. *J Biol Chem* 2004;279:32858-32868.
146. Christ B, Fleig WE. [Hepatocyte transplantation]. *Med Klin (Munich)* 2005;100:650-655.
147. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther* 1992;53:275-354.
148. Burke ZD, Tosh D. The Wnt/beta-catenin pathway: master regulator of liver zonation? *Bioessays* 2006;28:1072-1077.
149. Hsu SC, Galceran J, Grosschedl R. Modulation of transcriptional regulation by LEF-1 in response to Wnt-1 signaling and association with beta-catenin. *Mol Cell Biol* 1998;18:4807-4818.
150. Spiegelman VS, Slaga TJ, Pagano M, Minamoto T, Ronai Z, Fuchs SY. Wnt/beta-catenin signaling induces the expression and activity of betaTrCP ubiquitin ligase receptor. *Mol Cell* 2000;5:877-882.
151. Noubissi FK, Elcheva I, Bhatia N, Shakoori A, Ougolkov A, Liu J, Minamoto T, et al. CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature* 2006;441:898-901.