

Aus der Fraunhofer-Einrichtung für Marine Biotechnologie

Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse

Systematische Untersuchung der Inkulturnahme adhärent wachsender Zellen

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von
Stephanie Frahm
aus Bad Oldesloe

Lübeck 2014

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Charli Kruse
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. med. Jens Habermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2015

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 23.03.2015

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
Zielsetzung:.....	12
3. Material und Methoden:.....	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Chemikalien:.....	13
3.1.2 Verbrauchsmittel:.....	15
3.1.3 Kits:.....	16
3.1.4 Geräte:.....	16
3.1.5 Software:.....	18
3.1.6 Primer:.....	18
3.1.7 Antikörper:.....	20
3.1.8 Medien:.....	21
3.1.9 Lösungen und Puffer:.....	22
3.1.10 Zellen, Gewebe und Tiere:.....	23
3.2 Methoden.....	24
3.2.1 Cre/LoxP Reportersystem:.....	24
3.2.2 Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen-Injektion:.....	25
3.2.3 Isolation exokriner Drüsenzellen:.....	26
3.2.4 Allgemeine Zellkulturmethoden:.....	27
3.2.4.1 Subkultivierung:.....	27
3.2.4.2 Zellzählung:.....	28
3.2.4.5 Auftauen kryokonservierter Zellen:.....	29
3.2.4.6 Bestimmung des Glukose-/Laktatgehaltes im Medium:.....	29
3.2.4.7 <i>Time-lapse</i> -Analysen der Zellen:.....	30
3.2.5 Molekularbiologische Methoden:.....	30
3.2.5.1 DNA-Isolation:.....	30
3.2.5.2 Genotypisierung des Mausstammes TG(Ela1)/FVB 129 S4 (B6):.....	31
3.2.5.3 RNA-Isolation:.....	33
3.2.5.4 Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA:.....	34
3.2.5.5 Reverse Transkription:.....	34
3.2.5.6 Quantitative Polymerase Kettenreaktion:.....	35

3.2.5.7 Kapillargelelektrophorese:	37
3.2.5.8 Globale Genexpressionsanalyse:	38
3.2.6 Proteinbiochemische Methoden:	40
3.2.6.1 X-Gal-Test:	40
3.2.6.2 Immuncytochemie:	41
3.2.6.3 Click-iT® Proliferationsassay:	41
4. Ergebnisse	43
4.1 Globale Genexpressionsanalyse	43
4.2 Untersuchungen zur Herkunft und Charakterisierung der stammzellartigen Zellpopulation	51
4.2.1 Charakterisierung der Zellpopulation	51
4.2.2 Untersuchung der Herkunft der Zellpopulation	57
5. Diskussion	70
5.1 Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen	71
5.2 Untersuchungen zur Herkunft und Charakterisierung der stammzellartigen Zellpopulation	78
5.2.1 Das Pankreas als Stammzellquelle	78
5.2.2 Charakterisierung der Zellpopulation aus dem Pankreas	82
5.2.3 Untersuchungen zur Herkunft der proliferativen Zellpopulation	84
5.3 Globale Genexpressionsanalyse	86
6. Fazit und Ausblick	92
7. Literaturverzeichnis	94
8. Anhang	101
8.1 Abbildungsverzeichnis	101
8.2 Tabellenverzeichnis	102
8.3 Abkürzungsverzeichnis	102
8.4 Eidesstattliche Versicherung	104
8.5 Danksagung	105

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Inkulturnahme und Kultivierung auf adhärent wachsende Zellen auswirken.

Hierfür wurde zunächst die Genexpression von Pankreasgewebe mit der von kultivierten exokrinen pankreatischen Zellen in einer globalen Genexpressionsanalyse verglichen. Dabei zeigte sich, dass sich die Genexpression durch die Inkulturnahme innerhalb der ersten 48 Stunden dramatisch änderte. Die Zellen verloren innerhalb dieser Zeit ihre pankreasspezifische Genexpression und somit ihren Phänotyp. Gleichzeitig wurden Gene ganz unterschiedlicher biologischer Funktionen und Regelnetzwerke differenziell exprimiert. Dadurch ist das Muster dieser Regulation durch keinen der bekannten organismischen Prozesse alleine beschreibbar; stattdessen scheinen sich unterschiedliche Prozesse zu überlagern und auf diese Weise wechselseitig zu beeinflussen. Insgesamt nahm die Heterogenität der Zellpopulation rasch zu, was eine Stammzellartigkeit der Zellen zur Folge hatte.

In einem weiteren Experiment wurde mit Hilfe eines Reportersystems das Schicksal terminal differenzierter exokriner Zellen aus dem murinen Pankreas verfolgt, um zu analysieren, ob die daraus resultierende stammzellartige Zellpopulation durch *Selektion* existierender Stammzellen oder durch *Instruktion* differenzierter Zellen, einen plastischeren Zustand anzunehmen, entstanden ist. Hierbei zeigte sich, dass terminal differenzierte exokrine Zellen, die den überwiegenden Teil der Ausgangspopulation stellen, in der Lage sind, in der Zellkultur zu adhären. Diese Zellen konnten über einen Kultivierungszeitraum von fünf Passagen beobachtet werden. Ihr Anteil an der Gesamtpopulation nahm über die Dauer der Kultivierung stetig ab.

Zuletzt wurden drei grundlegende Schritte des Inkulturnehmens hinsichtlich ihrer Wirkung auf die resultierende Zellpopulation untersucht: (1) der enzymatische Verdau von Zellen und Geweben mit Kollagenase und Trypsin, (2) der Anteil des Serums im Medium und (3) die Adhäsion der Zellen an Zellkulturoberflächen. Es zeigte sich, dass die Möglichkeit zur Adhäsion an Zellkulturoberflächen den gravierendsten Effekt auf die Zellpopulation hat, gefolgt von der Kultivierung mit serumhaltigem Medium. Der Entzug eines dieser beiden

Faktoren resultierte in einer Abnahme der Proliferation und führte schließlich zum Tod der Zellen.

Zusammenfassend konnte aus allen Untersuchungen geschlossen werden, dass:

- 1) Zellen sich durch die Inkulturnahme drastisch und rapide verändern.
- 2) Diese Veränderung reproduzierbar ist.
- 3) Die Veränderung in einer Stammzellartigkeit der Zellen resultiert.
- 4) Die Veränderung der Zellen *in vitro* ein eigenständiges Phänomen ist. Dieses Phänomen ist nicht auf einen einzelnen physiologischen Prozess rückführbar, aber von großer technischer Bedeutung.
- 5) Die Veränderung sowohl durch *Instruktion*, als auch durch *Selektion* bewirkt wird; insbesondere die Ergebnisse des *Microarrays* legen nahe, dass hierbei, zumindest anfänglich, die *Instruktion* überwiegt.

2. Einleitung

Die *in vitro*-Kultivierung von Zellen und Geweben hat seit ihrer ersten publizierten Beschreibung im Jahre 1911 durch Carrel und Burrows (Carrel and Burrows 1911) immer stärker an Bedeutung gewonnen. Heute wird sie in mehr als 200 Publikationen pro Jahr beschrieben und ist das Mittel der Wahl für viele verschiedenen Fragestellungen. So werden Untersuchungen zu metabolischen Prozessen (Vaughan 1987), der Signaltransduktion (Robey, Young et al. 1987; Toledo and Wahl 2006), dem Transport von Proteinen und anderen Zellbestandteilen (Stuart, Mackay et al. 1993), der Proteinbiosynthese (McKenzie and Meselson 1977), der Zell-Zell-Kommunikation (Suzuki, Furuno et al. 1999) und der Charakterisierung von Zellpopulationen an Zellen außerhalb des Organismus durchgeführt (Barry and Murphy 2004).

Darüber hinaus können sowohl Zellen, als auch Gewebe *in vitro* als organotypische Testsysteme, beispielsweise für Medikamenten- und Toxizitätstests (Lin, Huang et al. 2006) oder Untersuchungen zur Wundheilung bzw. der Regeneration von geschädigtem Gewebe (Jackson, Majka et al. 2001; Egaña, Danner et al. 2009; Salem, Ciba et al. 2009) eingesetzt werden und bieten somit eine gute Alternative zu Tierversuchen (Schmitz 2009).

Ein weiterer großer Vorteil ist die Möglichkeit große Mengen eines bestimmten Zelltyps zu generieren. Hierfür werden Bioreaktoren genutzt, in denen die Zellen in Suspension oder adhärent auf einem Trägermaterial wachsend in großem Maßstab gezüchtet werden. Dies dient unter anderem der Herstellung von Zellbestandteilen, wie Proteinen, Fettsäuren oder Antikörpern (Merten 2006), aber auch der Produktion von Zellen für die künstliche Herstellung von Geweben (*Tissue Engineering*) (Freshney 2010). Bereits heute werden *in vitro* hergestellte Zellpopulationen in klinischen Studien, zum Beispiel für die Regeneration des Herzwes nach einem Infarkt, genutzt (Wollert, Meyer et al. 2004).

Es gibt zwei grundlegend unterschiedliche Arten von *in vitro*-Zellkultursystemen. Zum einen können Zellen, wie beispielsweise hämatopoetische Stammzellen, in Suspension gehalten werden, zum anderen werden Zellen auf einer Oberfläche adhärent wachsend kultiviert. Zu den Zellen, die ein Substrat benötigen, an das sie anhaften können, gehören die meisten Zelltypen, die aus Vertebraten gewonnen werden können (Berk and Baltimore 2000).

Die adhärenzte Kultivierung von Zellen kann wiederum auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Zum einen können Zellen zweidimensional auf einer hydrophilierten Kunststoffoberfläche kultiviert werden und bilden einen einlagigen Zellrasen. Die meisten Primärzellkulturen sind kontakthinhibiert und stellen ihr Wachstum bei einer bestimmten Zelldichte ein. Eine Ausnahme davon bilden Krebszelllinien, die keine Kontakthinhibition aufweisen und deshalb in mehreren Lagen übereinander wachsen können (Zeng and Hong 2008). Zum anderen können Zellen dreidimensional als Spheroide in sogenannten *Hanging Drops* (Johnson and Beeson 1966) oder auf und in Matrices, die zum Beispiel aus Kollagenen oder Polymeren bestehen, wachsen. Eine dreidimensionale Kultivierung entspricht eher den Bedingungen *in vivo* und kann durch die Wahl des Trägermaterials gewebsspezifische Eigenschaften simulieren (Tibbitt and Anseth 2009).

Für viele Untersuchungen können bereits etablierte Zelllinien kommerziell erworben werden, häufig werden aber auch Primärkulturen aus frisch isolierten Zellen angelegt. Das Anlegen einer Zellkultur folgt dabei in der Regel einer Abfolge von drei Schritten: der Dissoziation des Gewebes, der Reinigung der Zellsuspension und der Aussaat der Zellen (Abbildung 1).

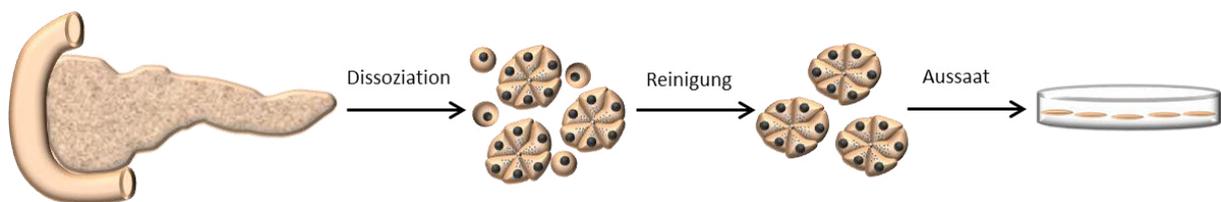


Abbildung 1: Inkulturnahme exokriner pankreatischer Acini. Zunächst wird das Organ mechanisch und enzymatisch dissoziiert, die entstandene Zellsuspension mittels Filtration gereinigt und die exokrinen Zellen in eine Zellschale überführt.

Zunächst wird hierfür das Gewebe aus dem Organismus entnommen und mechanisch zerkleinert. Die Dissoziation des Gewebes in Einzelzellen und kleine Gewebesteile erfolgt durch den Verdau mit Proteasen, wie Kollagenase, Dispase oder Trypsin. Im Anschluss wird die entstandene Zellsuspension durch Filtration, Dichtegradientenzentrifugation oder Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie weiter gereinigt und in Zellkulturgefäße überführt. Diese Gefäße bestanden früher aus Glas, heute sind sie jedoch meist aus hydrophilisiertem Polystyrol und können je nach Zelltyp zusätzlich mit Proteinen der Extrazellulären Matrix, wie Kollagen, Laminin oder Fibronectin, essentiellen Aminosäuren,

wie L-Lysin, oder mit dem für die Blutgerinnung verantwortlichen Protein, Fibrin, beschichtet werden (Schmitz 2009).

Auch die Kultivierung der adhärennten Zellen folgt oft einem standardisierten Protokoll. Die Zellen werden mit kommerziell erhältlichen Nährmedien versorgt, die je nach Hersteller unterschiedliche Anteile an Zuckern, Vitaminen, Aminosäuren, Fettsäuren und anorganischen Salzen enthalten. Häufig genutzt werden hierfür Medien wie DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), MEM (*Modified Eagle Medium*), Leibovitz's L-15 und RPMI (entwickelt am *Roswell Park Memorial Institute*). Zusätzlich werden den Medien in der Regel Seren zugesetzt, die eine Vielzahl an Proteinen, Wachstumsfaktoren und Hormonen enthalten. Hierbei wird oft fetales Kälberserum (FKS) eingesetzt, aber auch Seren anderer Spezies finden in der Kultivierung von Zellen Verwendung. Für den Einsatz in der Klinik unter allogenen Bedingungen wird humanes Serum verwendet. Bei Erreichen der Konfluenz einer Zellpopulation werden die Zellen auf eine nächst größere Wachstumsoberfläche passagiert. Hierfür werden sie wiederum mit Proteasen, wie Trypsin oder Accutase, von der Zellkulturoberfläche und voneinander gelöst (Abbildung 2) (Schmitz 2009).

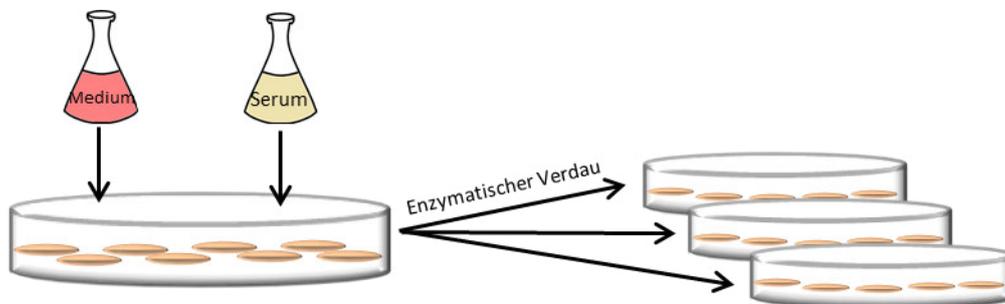


Abbildung 2: Kultivierung und Propagation adhärennt wachsender Zellen. Die Zellen werden in Nährmedium mit 10 % Serum kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz werden die Zellen enzymatisch von der Wachstumsoberfläche gelöst und auf eine größere Wachstumsoberfläche passagiert.

Zwar gibt es eine große Bandbreite an Anwendungsmöglichkeiten für *in vitro* kultivierte Zellen, jedoch stößt dieses Verfahren auch an Grenzen: Terminal differenzierte Zellen können *in vitro* nur über einen kurzen Zeitraum beobachtet und eventuell wieder in den Organismus eingebracht werden, da sie die Inkulturnahme nicht überleben, oder schon bald nach der Isolation aus dem Gewebe ihren differenzierten Phänotyp, und somit auch ihre ursprüngliche Funktion, verlieren.

Dieses Phänomen wurde bereits für viele Zelltypen beobachtet und ist insofern problematisch, als dass die Zellen nicht mehr dem ursprünglichen Zelltyp entsprechen, und somit auch physiologischen Fragestellungen nicht mehr untersucht werden können. Zudem ist dadurch die Vermehrung differenzierter Zelltypen für die Zucht von Geweben, wie beispielsweise von Chondrozyten für den Knorpelersatz, nicht möglich.

In der Vergangenheit gab es schon Bemühungen, das Prinzip, das hinter diesem Phänomen liegt, zu klären und Wege zu finden, den Verlust der spezifischen Funktion von Zellen zu verhindern. Hierbei wurden einige mögliche Erklärungen gefunden: Die Veränderungen, die durch den Verlust der zellulären Integrität hervorgerufen werden können zum Beispiel Ähnlichkeiten mit den Prozessen aufweisen, die in der Wundheilung, einer Entzündung oder einer Immunreaktion beobachtet werden können. Auch sind Vorgänge wie eine Dedifferenzierung oder eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) der Zellen mögliche Ursachen für deren Phänotyp-Veränderung.

Die Arbeitsgruppe um Alge et al. untersuchte beispielsweise retinale Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) und beschrieben, dass diese Zellen durch die Kultivierung ihren ursprünglichen Phänotyp verloren (Alge, Suppmann et al. 2003). Für die Analyse dieses Phänomens verglichen sie kultivierte mit frisch isolierten RPE-Zellen in einer globalen Proteom-Analyse und fanden dabei einige differenziell exprimierte Proteine. Vor allem für die Funktionalität der RPE-Zellen notwendige Proteine, wie RPE65, CRALBP (*cellular retinaldehyde-binding protein*) und CRBP (*cellular retinol-binding protein*), waren in den kultivierten Zellen nicht mehr nachweisbar. Proteine, die für die Adhäsion, die Migration, die Morphologie und die Translation notwendig sind, wurden hingegen verstärkt exprimiert. Der Effekt, den die *in vitro*-Kultur auf die Proteinexpression der Epithelzellen hatte, wies große Ähnlichkeit zu den Veränderungen auf, die diese Zellen im Falle einer proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) eingehen und wurde deshalb als Dedifferenzierung beschrieben.

Auch andere Autoren konnten eine Veränderung der Zelldifferenzierung beobachten. Holtzer et al. zeigten, dass Chondrozyten aus dem Huhn nach neun Tagen *in vitro* ihre Differenzierung verloren und weder durch die Transplantation in einen Hühnerembryo oder die Aderhaut eines Hühnereis, noch durch die Ko-Kultur mit Muskelgewebe, redifferenziert

werden konnten. Sie nahmen an, dass Zellwachstum und Differenzierung Antagonisten seien und unterdrückten die Proliferation der Zellen durch eine Serum-freie Kultivierung. Doch auch so ließ sich keine Redifferenzierung induzieren. Das beobachtete Phänomen wurde auch hier als eine Dedifferenzierung der Zellen beschrieben (Holtzer, Abbott et al. 1960).

In vivo kann eine Dedifferenzierung der Zellen unter bestimmten Bedingungen auftreten: So kann beispielsweise während der Regeneration von Nervengewebe eine Dedifferenzierung der Schwanzzellen beobachtet werden (Mirsky, Woodhoo et al. 2008). Auch bei Krankheiten wie zum Beispiel der Diabetes, bei der β -Zellen dedifferenzieren (Talchai, Xuan et al. 2012; Weir, Aguayo-Mazzucato et al. 2013) oder der proliferativen Vitreoretinopathie, bei der retinale Pigmentepithelzellen ihre Differenzierung verlieren (Alge, Suppmann et al. 2003) ist eine Dedifferenzierung *in vivo* bekannt. Zudem verlieren Krebszellen ihre Differenzierung *in vivo*, wenn sie aus dem Tumor migrieren (Gabbert, Wagner et al. 1985).

Ein anderer möglicher Mechanismus, der den Verlust der Differenzierung einer Zelle verursacht, ist eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT). Fanjul et al. untersuchten *in vivo* und *in vitro* das Vorkommen der EMT und beschrieben einen zwei-stufigen Prozess, den exokrine pankreatische Acini nach ihrer Isolation unterlaufen. Zunächst de- oder transdifferenzierten die exokrinen Zellen in Suspensionskultur zu einem gangzellartigen Phänotyp. Dieser Zelltyp exprimierte CK19, CK7 und CA II und zeigten mit einer globalen E-Cadherin-Expression einen epithelialen Ursprung. Außerdem konnte in dem größten Teil dieser Zellpopulation nukleäres PDX-1 nachgewiesen werden. Nach der Überführung auf oberflächenbehandelte Zellkultur-Gefäße, unterliefen die Zellen einer EMT und bildeten eine proliferative Population. Diese Population exprimierte neben den epithelialen Markern CK7 und CK19 auch die mesenchymalen Marker Vimentin und N-Cadherin und zeigte mesenchymale Stammzellmarker, wie CD90 und CD105. Interessanterweise konnte auch *in vivo* die Ko-Expression von Vimentin und CK19 in Gangepithelzellen nachgewiesen werden. Zudem wurde eine Ko-Expression von Vimentin und Glucagon oder Amylase als Hinweis auf eine Beteiligung der EMT bei der Regeneration von exokrinem und endokrinem Pankreasgewebe gewertet (Fanjul, Gmyr et al. 2010).

Russ et al. bestätigten diese Hypothese auch für pankreatische β -Zellen mit Hilfe eines Insulin-abhängigen Reportersystems. Sie beobachteten die schnelle Dedifferenzierung der markierten Zellen und einen Anstieg der mesenchymalen Marker α -SMA, N-Cadherin und Vimentin. Zudem konnte die Expression von Markern mesenchymaler Stammzellen, wie CD73, CD90 und CD105, gezeigt werden. Die entstandene Zellpopulation war proliferativ, konnte aber nicht in mesodermale Zellen differenziert werden. Somit konnten sie zeigen, dass β -Zellen in Kultur eine epithelial-mesenchymale Transition unterliefen, diese aber keine Multipotenz der Zellen induzierte (Russ, Ravassard et al. 2009).

Auch im Organismus kommt unter bestimmten Umständen eine EMT vor. In der Embryonalentwicklung beispielsweise transformiert sie epitheliale in mesenchymale Zellen, die in der Lage sind, die Gewebsarchitektur zu durchbrechen und zu migrieren. Desweiteren wird sie in Tumoren beobachtet, die von einem invasiven in einen metastatischen Zustand übergehen (Birchmeier, Birchmeier et al. 1996; Thiery, Acloque et al. 2009). Auch bei Krankheiten, wie der Fibrose, oder als Antwort auf eine Verletzung, kann eine EMT beobachtet werden (Willis and Borok 2007; Thiery, Acloque et al. 2009).

Das Phänomen der Veränderung des Phänotyps von Zellen nach dem Verlust der zellulären Integrität wurde also oftmals und für viele Zelltypen beschrieben. Bisher konnte allerdings keine allgemeingültige, auf alle Zelltypen übertragbare Erklärung für diese Beobachtung gefunden werden. In den bereits beschriebenen Ansätzen, diese Veränderungen zu erklären, bezogen sich die Autoren auf Mechanismen, die bereits aus dem Organismus bekannt waren und ähnliche Veränderungen der untersuchten Zellen hervorriefen.

Die eigentliche, bislang nie gestellte Frage ist jedoch, ob die Prozesse, die in der Zellkultur beobachtet werden können, überhaupt ein Pendant im Organismus aufweisen, oder ob Zellen, die aus dem Gewebsverband herausgelöst werden, nicht ein Verhalten zeigen, das an die Kultivierungsbedingungen angepasst ist und überhaupt keine organismische Funktion widerspiegelt.

Es ist gut möglich, dass zwar gewisse Mechanismen physiologischer Prozesse aufgegriffen werden, aber der gesamte Vorgang anders abläuft, indem er Teile unterschiedlicher Prozesse miteinander kombiniert.

Die Frage, ob diese Prozesse mit physiologischen Prozessen verglichen werden können, ist sehr grundlegend, da sich daraus die Frage ergibt, welche der bisher erzielten Ergebnisse überhaupt auf den Organismus übertragen werden können und somit, ob die Methode der *in vitro*-Kultivierung grundsätzlich für die Untersuchung physiologischer Funktionen geeignet ist, oder ob bislang lediglich gut reproduzierbare Artefakte beobachtet wurden?

Neben der Frage, inwiefern *in vitro* kultivierte Zellen für die Untersuchung physiologischer Mechanismen geeignet sind, stellt sich ebenfalls die Frage, welche Art von Zellen *in vitro* beobachtet werden kann. Es ist schwierig, kultivierte Zellen einem bestimmten Zelltyp im Gewebe zuzuordnen, da eine Charakterisierung der Zellen in den meisten Fällen erst nach deren Adhärenz erfolgt. Da die Zellen Kulturbedingungen ausgesetzt sind, die, zum Beispiel durch den Zusatz bestimmter Wachstumsfaktoren, bestimmte Zelltypen bevorzugen, kann die Ausprägung der Differenzierungsmerkmale eine Reaktion auf die Kulturbedingungen sein.

Im Fall adulter Stammzellpopulationen stellt sich deshalb die Frage, ob es sich tatsächlich um Stammzellen handelt, die so auch *in vivo* vorkommen. Oder handelt es sich um einen ursprünglich differenzierten Zelltyp, der durch den Verlust der Gewebsintegrität und die Kultivierungsbedingungen seine Differenzierung verliert und erst *in vitro* Stammzeleigenschaften entwickelt?

Erste Hinweise darauf, dass differenzierte Zellen in der Zellkultur eine große Plastizität entwickeln und stammzellartig werden, haben Rapoport et al. geliefert. Sie konnten zeigen, dass ein signifikanter Teil ($\approx 14\%$) der von ihnen isolierten humanen pankreatischen exokrinen Acini adhärenz wurde, die Propagation überlebte und eine drastische Änderung der Proteinexpression aufwies. Es entstand eine heterogene Population von Zellen mit Stammzeleigenschaften. So waren diese Zellen über einen langen Zeitraum proliferativ und differenzierten spontan in Zellen aus mindestens zwei Keimblättern. Zusätzlich konnte über den Kultivierungszeitraum beobachtet werden, dass die Expression pankreasspezifischer Proteine, wie Amylase, Insulin und PDX1, stark abnahm, während die Expression von Stammzellmarkern wie Nestin und Oct-4 anstieg (Rapoport, Schick Tanz et al. 2009).

Für die Herkunft dieser stammzellartigen Zellpopulation stellten Rapoport et al. drei mögliche Hypothesen auf:

- 1) Es handelt sich hierbei um seltene Stammzellen, die bereits im exokrinen Pankreasgewebe vorhanden und in der Lage waren, den Wechsel in die Zellkultur zu überleben. Diese Zellen besitzen ein Differenzierungspotential, das Keimblattgrenzen überschreitet. Eine andere Variante dieser Theorie nimmt an, dass es sich um nicht gewebständige, mobile Stammzellen handelt, die den Ursprung dieser Zelllinie darstellen (z.B. mesenchymale Stammzellen).
- 2) Den Ursprung der Zellpopulation stellen Zellen, die entarten, beginnen zu proliferieren und unterschiedliche Zelltypen aus sich hervorgehen lassen. In diesem Fall wäre eine reproduzierbare Generierung von Krebszelllinien der Effekt der Zellisolation.
- 3) Die isolierten, terminal differenzierten Zellen dedifferenzieren in der *in vitro*-Kultur und nehmen einen plastischeren Zustand an, der sie befähigt, zu proliferieren und in andere Zelltypen zu differenzieren.

Gegen die Annahme, dass es sich bei der Zellpopulation um Krebszellen handelt, sprachen allerdings mehrere Beobachtungen: Die Zelllinien waren in ihrem Wachstum kontaktinhibiert und stellten ihre Proliferation nach 55 Verdopplungen ein, während Krebszelllinien als unsterblich gelten. Sie zeigten keine chromosomalen Anomalien und auch nach einer Transplantation in immundefiziente Mäuse konnte keine Bildung maligner Tumore beobachtet werden.

Auch die Theorie der seltenen Stammzellspezies, die die Isolation übersteht und die nicht proliferativen exokrinen Zellen überwächst, wurde widerlegt: Das exokrine Pankreas besteht zu 97-98 % aus Acini, zentroacinar und Gangzellen, so dass Stammzellen höchstens einen Anteil von 2-3 % haben können. Immunocytochemische Färbungen bestätigten, dass nahezu alle Zellen Amylase exprimierten. Durch Zeitraffer-Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass exokrine Acini an der Zellkultur-Oberfläche anhafteten und alle Zellen gleichmäßig aus ihnen auswuchsen. Nach der ersten Propagation wuchsen 14 % der Zellen wieder an und exprimierten noch zu 15-20 % Amylase. Zusätzlich konnten in der *Time-lapse* Analyse weder

Zellteilungen noch Zelltod beobachtet werden, wodurch ein klonales Wachstum seltener Stammzellen ausgeschlossen werden konnte. Der größte Teil der stammzellähnlichen Zellpopulation musste also durch die Umwandlung exokriner Zellen entstanden sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Frage, was mit Zellen nach der Inkulturnahme geschieht und ob der Übergang in die Zellkultur mit physiologischen Prozessen vergleichbar ist, systematisch untersucht. Hierbei wurden die unterschiedlichen Aspekte der Inkulturnahme durch drei verschiedene Herangehensweisen betrachtet:

1. Die Bedingungen für den Übergang aus dem Gewebe in die Zellkultur wurden systematisch variiert, um den Einfluss unterschiedlicher Faktoren, wie den enzymatischen Verdau, die Kultivierung mit serumhaltigem Medium und die Adhäsion der Zellen an eine Zellkulturoberfläche auf das Zellwachstum, die Vitalität und die Stoffwechselaktivität zu untersuchen.
2. Es wurden *Lineage tracing*-Experimente für exokrine Pankreaszellen durchgeführt, um das Schicksal dieser terminal differenzierten Zellen *ex vivo* nachzuvollziehen.
3. Eine globale Genexpressionsanalyse wurde zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkulturnahme durchgeführt, um die Mechanismen, die der Phänotyp-Veränderung zugrunde liegen, zu analysieren.

Für die Untersuchungen wurden exokrine Zellen aus dem murinen Pankreas und der Unterkieferspeicheldrüse (*Glandula Submandibularis*) der Ratte verwendet, die mit hoher Effizienz isoliert und in Kultur genommen werden können und *in vitro* stammzellartige Eigenschaften aufweisen. Für die pankreatischen Zellen konnte in vorherigen Untersuchungen bereits gezeigt werden, dass sie *in vitro* ihre exokrinen Eigenschaften, wie die Expression von Verdauungsenzymen, verlieren und ein nahezu unbegrenztes Potential zur Selbsterneuerung aufweisen. Zudem besitzen sie die Fähigkeit komplexe Aggregate (*Organoid Bodies, OBs*) mit einer mehrschichtigen epithelialen Oberfläche und zentralen kanalähnlichen Strukturen zu bilden. Sie sind außerdem in der Lage, ähnlich wie embryonale Stammzellen, spontan in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren (Kruse, Birth et al. 2004; Kruse, Kajahn et al. 2006). Interessanterweise konnte ein sehr ähnlicher Zelltyp auch in der Unterkieferspeicheldrüse (*Glandula Submandibularis*) und der Ohrspeicheldrüse

(*Glandula Parotis*) gefunden werden (Kruse, Birth et al. 2004; Egaña, Danner et al. 2009; Gorjup, Danner et al. 2009).

Zielsetzung:

Ziel dieser Arbeit war es, den Übergang von Zellen aus dem Gewebe in die Zellkultur zu untersuchen. Hierfür wurde der Einfluss unterschiedlicher Faktoren der Inkulturnahme, wie der enzymatische Verdau von Zellen und Geweben mit Kollagenase und Trypsin, die Kultivierung mit serumhaltigem Medium und die Adhäsion der Zellen an Zellkulturoberflächen, auf die entstehende Zellpopulation untersucht.

Mit Hilfe eines Reportersystems wurde das Schicksal terminal differenzierter exokriner Zellen aus dem Pankreas verfolgt und analysiert, ob die daraus resultierende stammzellartige Zellpopulation durch *Selektion* von existierenden Stammzellen, oder durch *Instruktion* differenzierter Zellen entstanden ist.

Außerdem wurde mit Hilfe einer globalen Genexpressionsanalyse untersucht, wie sich die Inkulturnahme auf die gesamte Genexpression der Zellpopulation auswirkt, wie schnell die Anpassung der Genexpression an die veränderte Umgebung vonstattengeht und wie stark diese Expressionsänderungen ausfallen. Desweiteren wurde analysiert, welche Mechanismen der Phänotyp-Veränderung zugrunde liegen und ob diese Mechanismen mit physiologischen Prozessen vergleichbar sind.

3. Material und Methoden:

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien:

4',6-Diamidin-2-Phenylindol	Roche, Schweiz
10x Dream Taq Puffer	Fermentas, Deutschland
Aceton	Roth, Deutschland
Agarose	Roth, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deutschland
Bovines Serum Albumin	PAA Laboratories, Österreich
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deutschland
dNTPs	Fermentas, Deutschland
Dream Taq DNA Polymerase	Fermentas, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Gibco, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco, Deutschland
EDTA	Merck, Deutschland
Ethanol	Roth, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAA Laboratories, Österreich
Gentamycin	Biochrom, Deutschland
Glutamin	PAA Laboratories, Österreich
Glutaraldehyd	Sigma, Deutschland

3. Material und Methoden:

4-Hydroxytamoxifen	Sigma, Deutschland
HEPES	Roth, Deutschland
Kaliumferrocyanid ($K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$)	Sigma, Deutschland
Kaliumferricyanid $K_4Fe(CN)_6$	Sigma, Deutschland
Kalziumchlorid	Merck, Deutschland
Kollagenase	Serva, Deutschland
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Roth, Deutschland
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$, PCR)	Fermentas, Deutschland
Methanol	Roth, Deutschland
Modified Eagle's Medium	Biochrom, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	Roth, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich
Reagenz A (Lysepuffer)	Chemometec, Dänemark
Reagenz B (Stabilisierender Puffer)	Chemometec, Dänemark
RNAlater™	Qiagen, Deutschland
Saccharose	Roth, Deutschland
Sonnenblumenöl	Sigma, Deutschland
<i>QIAxcel Alignment Marker 15 bp / 500 bp</i>	Qiagen, Deutschland

3. Material und Methoden:

<i>QIAxcel Alignment Marker 15 bp / 1 kbp</i>	Qiagen, Deutschland
<i>Qx DNA Size Marker pUC18/HaeIII</i>	Qiagen, Deutschland
<i>Qx DNA Size Marker 50-800 bp</i>	Qiagen, Deutschland
Taq-Polymerase	Fermentas, Deutschland
Tris-HCl	Roth, Deutschland
Triton X-100	Fluka, Schweiz
Trypsin	PAA Laboratories, Österreich
Tween 20	VWR, Deutschland
Vectashield	Vector Laboratories, U.S.A.
X-Gal	Peqlab, Deutschland
Ziegennormalserum	Vector Laboratories, U.S.A.

3.1.2 Verbrauchsmittel:

6-Well-Zellkulturplatten	Techno Plastic Products, Schweiz
Deckgläschen	Eydam, Deutschland
Glaspipette (2ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Kanülen	Braun, Deutschland
Kryoröhrchen	TPP, Schweiz
PCR-Tubes	Kisker Biotech, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Deutschland
Propidiumiodid-Einwegkassette	Chemometec, Dänemark

3. Material und Methoden:

Reaktionsgefäße (Eppis)	Sarstedt, Deutschland
Spritzen	Braun, Deutschland
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²)	TPP, Schweiz
Zellkulturplatten	TPP, Schweiz
μ-slides	Ibidi

3.1.3 Kits:

<i>Ambion® WT Expression Kit</i>	Applied Biosystems, USA
<i>Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 Imaging Kit</i>	Invitrogen, USA
<i>Poly-A RNA Control Kit</i>	Affymetrix, USA
<i>RNeasy Plus Mini Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QuantiFast SYBR Green PCR Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>QuantiTect Reverse Transcription Kit</i>	Qiagen, Deutschland
<i>WT Terminal Labeling Kit</i>	Affymetrix, USA

3.1.4 Geräte:

Analysewaage	Kern, Deutschland
Brutschrank	Binder, Deutschland
CoolCell®	Biocision, USA

3. Material und Methoden:

Fluoreszenzmikroskop Observer. Z1	Zeiss, Deutschland
GeneTitan® Multi-Channel Instrument	Affymetrix, USA
Kapillargelelektrophorese QIAxcel	Qiagen, Deutschland
Nanodrop-Spektrophotometer NanoDrop 1000	PaqLab, Deutschland
Nukleinsäureaufreinigungsroboter QIAcube	Qiagen, Deutschland
Nucleocounter NC 100	Chemometec, Dänemark
Pipetten	Eppendorf, Deutschland
Pipettierroboter QIAgility	Qiagen, Deutschland
QIAcube	Qiagen, Deutschland
QIAxcel	Qiagen, Deutschland
qPCR Cycler Mastercycler ep Realplex ²	Eppendorf, Deutschland
Schüttelinkubator	Hassa, Deutschland
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Deutschland
Thermocycler Mastercycler	Eppendorf, Deutschland
<i>Time-lapse</i> Mikroskop Olympus IX81	Zeiss, Deutschland
Ultraschallbad	Elma, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Deutschland
Werkbank	Kojair, Finnland
YSI 2700 Select	Kreienbaum
Zellzählgerät Nucleocounter	ChemoMetec, Dänemark

3.1.5 Software:

AxioVision Rel. 4.8	Zeiss, Deutschland
BioCalculator 3.0	Qiagen, Deutschland
<i>GoMiner</i>	GBG of LMP, NCI, NIH; USA
ImageJ	National Institute of Health, USA
Microsoft Excel 2007	Microsoft, Deutschland
Microsoft PowerPoint 2007	Microsoft, Deutschland
Microsoft Word	Microsoft, Deutschland
realplex 2.2	Eppendorf, Deutschland

3.1.6 Primer:

Für die Genotypisierung von Tg(Ela1) FVB 129 S4 (B6) Mäusen:

	Primer	Sequenz
LoxP/LacZ	Mutant Reverse	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC
	Common	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT
	Wildtype Reverse	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG
Cre/Ert2	Transgene Forward	CTC TGC TAA CCA TGT TCA TGC CT
	Transgene Reverse	ACG CTA GAG CCT GTT TTG
	Internal Positive Control Forward	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG
	Internal Positive Control Reverse	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT

3. Material und Methoden:

Für die *Real-time PCR*:

Gen	Protein	Intron spannend	Amplikon- länge	Schmelz- temperatur	Hersteller- bezeichnung
ACTA2	α - smooth muscle actin (α -SMA)	+	71 bp	79,7 °C	Mm_Acta2_1_SG
ACTB	β -Aktin	+	149 bp	89,7 °C	Mm_Actb_1_SG
AMY1	Amylase 1	+	131 bp	79,9 °C	Mm_Amy1_1_SG
Col8a1	Kollagen Typ VIII, α	+	88 bp	83,1 °C	Mm_Col8a1_2_SG
Col12a1	Kollagen Typ XII, α	+	102 bp	83,2 °C	Mm_Col12a1_1_SG
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	+	78 bp	82,3 °C	Mm_Ctgf_1_SG
FGF7	Fibroblast growth factor 7	+	122	83,9 °C	Mm_Fgf7_1_SG
FOSL1	FOS-like antigene 1	+	104	87,8 °C	Mm_Fosl1_1_SG
GATA4	GATA4	+	113	89,0 °C	Mm_Gata4_1_SG
GP2	Glykoprotein 2	+	139	84,3 °C	Mm_Gp2_1_SG
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2			84,0 °C	Mm_Hmga2_
IL-6	Interleukin 6	+	128	82,4 °C	Mm_Il6_1_SG
Ki67	Ki67	+	99	81,2 °C	Mm_Mki67_2_SG
KLF4	Krüppel-like factor 4	+	66	83,4 °C	Mm_Klf4_1_SG
Nestin	Nestin	+	112 bp	84,8 °C	Mm_Nes_2_SG
NEFH	Neurofilament heavy chain	+	68 bp	83,9 °C	Mm_Nefh_1_SG
NEFL	Neurofilament light chain	-	145 bp	82,7 °C	Mm_Nefl_1_SG
NEFM	Neurofilament medium chain	+	109 bp	84,8 °C	Mm_Nefm_1_SG
Oct-4	Octamer-binding transcription factor 4	+	101 bP	-	Mm_Pou5f1_1_SG
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1	+	94 bp	85,7 °C	Mm_Pdx1_1_SG
RIPK3	Receptor interacting serin-threonin kinase 3	+	149	86,9 °C	Mm_Ripk3_1_SG
TIMP1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1	-	134	82,6 °C	Mm_Timp1_1_SG
TRY4	Trypsin 4	+	137	85,7 °C	Mm_Try4_1_SG
WISP1	WNT1-inducible-signaling pathway protein 1	+	105	87,8 °C	Mm_Wisp1_

3. Material und Methoden:

3.1.7 Antikörper:

Zielstruktur	Abkürzung	Fixierung	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Alpha Smooth Muscle Actin	α -SMA	Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:200	Abcam ab5694
Amylase		Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:100	Santa Cruz sc 25562
Cytokeratin 18	Ck 18	Methanol/ Aceton	Maus monoklonal	1:200	Santa Cruz sc 51582
Elastase		Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:100	Santa Cruz sc 292230
IgG Maus		Methanol/ Aceton	Maus polyklonal		Santa Cruz
IgG Rabbit		Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal		Santa Cruz
Ki67		Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:200	Abcam ab15580
Krüppel-like factor 4	KLF4	Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:200	Millipore AB4138
Nanog		Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:1000	Millipore AB5731
Nestin		Methanol/ Aceton	Maus monoklonal	1:250	Santa Cruz sc 33677
Neurofilament Light chain	NF-L	Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:500	Thermo Scientific PA1-10014
Neurofilament Medium and Heavy chain	NF-H&M	Methanol/ Aceton	Maus monoklonal	1:500	Millipore MAB1592
Nucleostemin		Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:500	Santa Cruz sc 67013
Octamer binding transcription Factor 4	Oct-4	Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:200	Santa Cruz sc 9081

3. Material und Methoden:

Zielstruktur	Abkürzung	Fixierung	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
Pancreatic and duodenal homeobox 1	PDX1	PFA/TritonX	Kaninchen polyklonal	1:500	Millipore AB3505
Sex determining region Y-Box2	Sox2	Methanol/ Aceton	Kaninchen polyklonal	1:250	Abcam ab69893

3.1.8 Medien:

10 % FKS-DMEM Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

10 % fetales Kälberserum (FKS)

1 U/ml Penicillin

10 mg/ml Streptomycin

20 % FKS-DMEM Medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

20 % fetales Kälberserum (FKS)

1 U/ml Penicillin

10 mg/ml Streptomycin

10 µg/ml Gentamycin

Digestionsmedium: 10 mM HEPES Puffer

70 % (v/v) Modified Eagle's Medium

1 % (w/v) bovines Serumalbumin

1,8 mM Glutamin

0,5 mM Kalziumchlorid

1,1 PZU/mg Kollagenase

3. Material und Methoden:

Einfriermedium:	10 % (v/v) Dimethylsulfoxid
	90 % (v/v) fetales Kälberserum
Isolationsmedium:	10 mM HEPES Puffer
	70 % (v/v) Modified Eagle´s Medium
	1 % (w/v) bovines Serumalbumin
	1,8 mM Glutamin
	0,5 mM Kalziumchlorid

3.1.9 Lösungen und Puffer:

Methanol/ Aceton	70 % Methanol
	30 % Aceton
PBS	138 mM Natriumchlorid
	8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat
	2,7 mM Kaliumchlorid
	1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
PFA	4 % PFA
	10 % Saccharose
	Ad A. dest
Phosphatpuffer 0,1M	73 mM Na ₂ HPO ₄
	27 mM NaH ₂ PO ₄
	Ad A. dest

3. Material und Methoden:

TBST	150 mM Natriumchlorid
	10 mM Tris (pH 8,8)
	0,05 % Tween 20
X-Gal Fixierungspuffer	5 mM EDTA
	2 mM MgCl ₂
	0,2 % Glutaraldehyd
	Ad 0,1 M Phosphatpuffer
X-Gal Waschpuffer	2 mM MgCl ₂
	Ad 0,1 M Phosphatpuffer
X-Gal Färbepuffer	2 mM MgCl ₂
	5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ ·3H ₂ O
	5 mM K ₃ Fe(CN) ₆
	1 mg/ml X-Gal
	Ad 0,1 M Phosphatpuffer

3.1.10 Zellen, Gewebe und Tiere:

Adulte Stammzellen aus dem exokrinen Pankreas transgener männlicher Mäuse der Linie TG(Ela1)/FVB 129 S4 (B6) (Charles River).

Adulte Stammzellen aus dem exokrinen Pankreas männlicher Mäuse der Linie FVB/NJ (Charles River).

Adulte Stammzellen aus der Speicheldrüse männlicher Wistar-Ratten (Charles River).

3.2 Methoden

3.2.1 Cre/LoxP Reportersystem:

Für die Untersuchung der Herkunft einer proliferierenden stammzellähnlichen Zellpopulation wurden stabil markierte exokrine Zellen aus dem Pankreas generiert, in Kultur genommen und nach einiger Zeit der Subkultivierung *in vitro* nachgewiesen.

Diese stabile Markierung erfolgt durch den Einsatz eines Cre/LoxP-Reportersystems (Sternberg and Hamilton 1981; Sauer and Henderson 1988), welches ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1 stammt und die gezielte Entfernung von DNA-Sequenzen aus lebenden Organismen ermöglicht. Hierfür wird zum einen eine Cre-Rekombinase (*causes recombination*) eingesetzt, die die Spaltung und Neuverknüpfung spezifischer Basensequenzen, den loxP-Sites (*locus of crossing over (x)*), zu katalysieren. Durch diese Spaltung und Neuverknüpfung der DNA wird eine von den loxP-Sites flankierte Stopp-Sequenz herausgeschnitten, die die Expression des aus *E. coli* stammenden LacZ-Gens blockiert.

Die Cre-Rekombinase wird durch einen Elastase1-Promotor reguliert und ist somit spezifisch für exokrine Pankreaszellen. In Zellen, in denen die Rekombinase exprimiert und somit das Reporterkonstrukt geschnitten wird, kann die Expression der vom LacZ-Gen codierten β -Galactosidase nachgewiesen werden (Abbildung 3). Um die Aktivierung des Reportersystems zeitlich induzierbar zu machen, ist die Rekombinase mit einer modifizierten Ligandenbindungsdomäne von Estrogen-Rezeptoren fusioniert, die nicht mehr körpereigenes Estrogen, sondern synthetisches Tamoxifen binden kann. Erst nach Gabe von Tamoxifen wird die Rekombinase aktiviert und kann in den Zellkern gelangen, um dort das Reporterkonstrukt zu schneiden.

3. Material und Methoden:

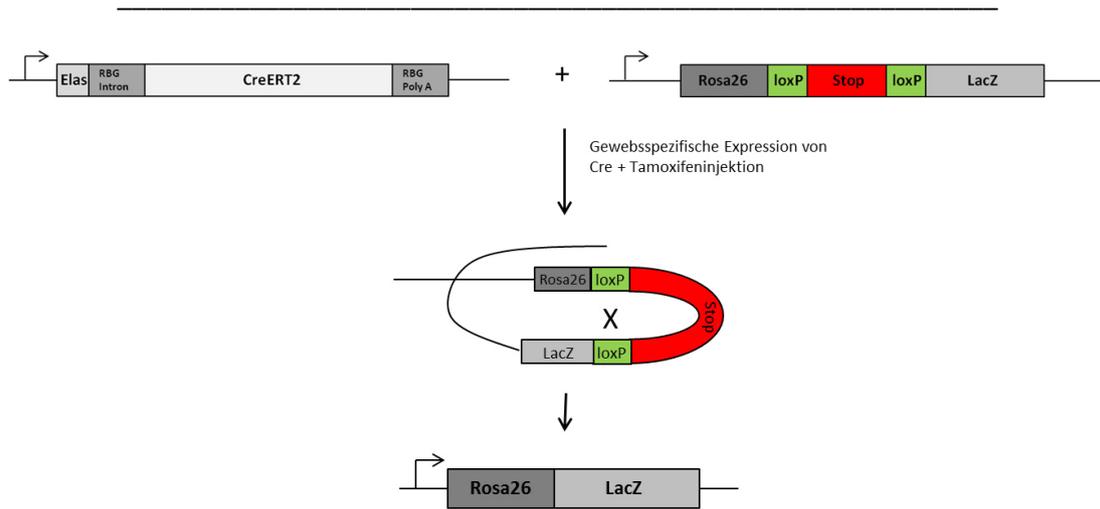


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cre/LoxP-Reportersystems. Die Induktion der Cre-Rekombinase mittels Tamoxifen ermöglicht die Exzision der loxP-flankierten Stopp-Sequenz in Elastase exprimierenden Geweben. Nach Entfernung der Stopp-Sequenz kann die Expression der β -Galactosidase im Gewebe nachgewiesen werden.

Für die Generierung eines Mausstammes mit stabil markierten exokrinen Pankreaszellen wurden Männchen des Mausstammes *FVB.129S4(B6)-Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor}/J* (Charles River), die das LacZ-Gen aus E.coli downstream einer von LoxP-Sites flankierten Stoppssequenz tragen (Wagner, McAllister et al. 2001), und Weibchen des Stammes *Tg(Ela1Cre/ERT2)1Stof/J* (Charles River), die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines Elastase1-Promotors tragen, gekreuzt (Desai, Oliver-Krasinski et al. 2007). Der daraus resultierende Mausstamm trägt die Bezeichnung *Tg(Ela1)FVB 129 S4(B6)*.

3.2.2 Aktivierung der Cre-Rekombinase durch Tamoxifen-Injektion:

Die von dem transgenen Mausstamm *Tg(Ela1)FVB 129 S4 (B6)* exprimierte Cre-Rekombinase ist an eine modifizierte Ligandenbindungsdomäne von Estrogen-Rezeptoren gebunden und liegt somit in einer inaktiven Form im Cytoplasma der Zellen vor. Um die Rekombinase zu aktivieren und somit ihren Transport in den Zellkern zu gewährleisten, muss das synthetische Antiestrogen Tamoxifen an diese Ligandenbindungsdomäne binden.

Die intraperitoneale Injektion von 5 mg 4-Hydroxytamoxifen je 40 g Körpergewicht erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Hierfür wurde eine 10 mg/ml 4-Hydroxytamoxifen Stock-Lösung hergestellt, indem das Tamoxifen zunächst in 1 Teil 99 % Ethanol und

anschließend in 8 Teilen Sonnenblumenöl gelöst wurden. Für eine homogene Lösung wurde das Gemisch im Anschluss und vor jeder Injektion 10 min bei Raumtemperatur in einem Ultraschallbad sonifiziert. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Genickbruch getötet, die Organe entnommen, die Zellen daraus isoliert und in Kultur genommen.

3.2.3 Isolation exokriner Drüsenzellen:

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten exokrinen Drüsenzellen aus dem murinen Pankreas und aus Speicheldrüsen der Ratte wurden nach einem bereits etablierten Protokoll (Kruse, Birth et al. 2004; Kruse, Kajahn et al. 2006) isoliert. Hierfür wurden die zuvor exzidierten Drüsen von umgebendem Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend mit einer chirurgischen Schere zerkleinert. Die Gewebestücke wurden in Kollagenase-haltigem Digestionsmedium aufgenommen, mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Kohlendioxid (95 % v/v) begast und bei 37 °C unter Schütteln (150 Upm) für 20 min und ein weiteres Mal für 15 min inkubiert. Zwischen den Inkubationsschritten wurden die Gewebestücke mit Isolationsmedium, d.h. Digestionsmedium ohne Kollagenase-Zusatz, gewaschen, um restliches Fettgewebe zu entfernen und erneut mit einer Schere zerkleinert. Anschließend an die zweite Inkubation wurde das Gewebe mit Hilfe von serologischen Pipetten mit kleiner werdendem Durchmesser (20 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml) resuspendiert und somit fast vollständig dissoziiert. Die so aus dem Gewebe gelösten Acini wurden durch eine Filtration mit Hilfe eines 200 µm Gazefilters angereichert und im Anschluss fünf Minuten bei 130 g zentrifugiert. Bei Bedarf erfolgte ein zusätzlicher Waschschrift mit 20 % FKS-DMEM. Schließlich wurde das Zellpellet in 20 % FKS-DMEM und 1 % Gentamycin aufgenommen und in einem entsprechend großen Zellkulturgefäß ausgesät. Zellen, bei denen der Effekt des Serumgehalts getestet werden sollte, wurden entsprechend in 10 %, 5 % oder 1 % FKS-DMEM aufgenommen. Die Acini wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Für die Untersuchung des enzymatischen Verdaus während der Präparation wurden Zellen aus den Speicheldrüsen männlicher Wistar Ratten nach Protokoll isoliert. Die Präparation

ohne Kollagenase erfolgte wie oben beschrieben, allerdings ausschließlich mit Isolationsmedium.

Speicheldrüsenzellen, die nicht adhärent kultiviert werden sollten, wurden auf 2 % Agarose-beschichtete bakteriologische Zellkulturschalen ausgesät und mit CaCl₂-freiem FKS-DMEM, das mit 0,06 mM CaCl₂ versetzt wurde, kultiviert.

3.2.4 Allgemeine Zellkulturmethoden:

3.2.4.1 Subkultivierung:

Die Subkultivierung von Zellen erfolgte nach Erreichen der Konfluenz. Hierfür wurde zunächst das Zellkulturmedium durch Absaugen und zusätzliches Spülen mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*) vollständig entfernt. Zum Ablösen des Zellrasens wurde entsprechend der Flaschengröße so viel 0,1 % Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben, dass der Flaschenboden gerade bedeckt war. Nach einer zweiminütigen Inkubation der Zellen bei 37 °C, der optimalen Wirktemperatur von Trypsin, wurden die Zellen durch vorsichtiges Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Zellen, die sich so nicht ablösen ließen, wurden zusätzlich mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Wirkung des Trypsins wurde durch die Zugabe des doppelten Volumens 10 % FKS-DMEM inhibiert, die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 180 g pelletiert. Das Zellpellet konnte nun in frischem 10 % Medium aufgenommen und auf einer nächst größeren Kulturflasche ausgesät oder eingefroren werden. Nach der ersten Propagation der Zellen wurde der FKS-Anteil im Medium von 20 % auf 10 % reduziert. Ein Medienwechsel fand alle drei bis vier Tage statt. Für die Versuche wurden Zellen der ersten 13 Passagen verwendet.

Für die Untersuchung des Effektes von Trypsin auf die Zellpopulation wurden Zellen ohne Trypsin, durch Schaben, von der Zellkulturoberfläche gelöst.

Zellen, die für die Untersuchung des Serum-Effektes eingesetzt wurden, wurden entsprechend in 10 %, 5 % oder 1 % FKS-DMEM kultiviert.

3.2.4.2 Zellzählung:

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde der Nucleocounter der Firma Chemometec verwendet. Dieses Gerät ist in der Lage die Fluoreszenz von Zellkernen lysierter Zellen, die mit Propidiumiodid angefärbt wurden, zu detektieren. Hierfür werden die Zellen zunächst wie auch bei der Subkultivierung unter Zuhilfenahme von Trypsin vom Zellkulturgefäß abgelöst und 50 µl der entstandenen Zellsuspension für die Analyse in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden mit dem gleichen Volumen eines Lysispuffers (Puffer A) und anschließend mit 50 µl eines Stabilisierungspuffers (Puffer B) versetzt. Die so freigelegten Zellkerne wurden in eine Einwegkassette aufgenommen und das darin enthaltene Propidiumiodid konnte in die DNA interkalieren. Die fluoreszierenden Zellkerne wurden im Nucleocounter detektiert und mit einer internen Bildverarbeitungssoftware analysiert. Aus der angegebenen Zellzahl pro ml konnte die Gesamtzellzahl berechnet werden.

3.2.4.4 Kryokonservierung:

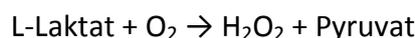
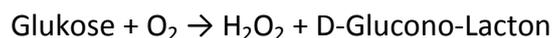
Die längerfristige Verwahrung der Zellen fand in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -159 °C statt. Hierfür wurden die konfluent gewachsenen Zellen zunächst wie bei der Subkultivierung vom Flaschenboden gelöst und mit Hilfe einer Zentrifuge bei 180 g pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einem Medium aus 90 % FKS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Das DMSO diene hierbei als Frostschutzmittel, welches die Entstehung von Eiskristallen während des Einfrierprozesses verhindert. Die Zellen wurden in CoolCell®-Boxen kontrolliert mit 1 °C pro Minute in einem -80 °C Gefrierschrank abgekühlt und anschließend in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank überführt.

3.2.4.5 Auftauen kryokonservierter Zellen:

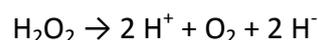
Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und in einer auf -20 °C gekühlten Box zwischengelagert. Die Zellen wurden anschließend zügig in einem 37 °C Wasserbad aufgetaut und in ein 15 ml Röhrchen mit 5 ml vorgewärmtem 10 % FKS-DMEM überführt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 180 g wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 % DMEM aufgenommen und auf ein Zellkulturgefäß entsprechend seiner Größe ausgesät.

3.2.4.6 Bestimmung des Glukose-/Laktatgehaltes im Medium:

Für die Überwachung der Stoffwechselaktivität der Zellen wurde der *Analysator YSI 2700 Select* der Firma Kreienbaum genutzt, mit dessen Hilfe Glukose und Laktat vor dem Medienwechsel gemessen wurden. In diesem Gerät sind an jeweils einer Cellulose-Membran die Enzyme Glukose-Oxidase und Laktat-Oxidase immobilisiert, die folgende Reaktionen katalysieren:



Wird die Membran nun einer Flüssigkeit mit dem entsprechenden Substrat ausgesetzt, kommt es zu dessen Umsetzung unter der Bildung von Wasserstoffperoxid. Dieses wird anschließend an einer Elektrode mit Platinanode oxidiert. Der entstehende Strom ist proportional zur Substratkonzentration.



Die Substratkonzentration wurde in g/l angegeben und als Glukoseverbrauch bzw. Laktatproduktion grafisch dargestellt.

3.2.4.7 Time-lapse-Analysen der Zellen:

Für die Erstellung von Zeitrafferaufnahmen der Zellen wurde das Olympus IX81 *Time-lapse* Mikroskop genutzt, das eine Inkubationskammer besitzt, in der die Zellen unter optimalen Bedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂ über einen Zeitraum von 7 Tagen kultiviert wurden. Gestartet wurden die Aufnahmen 48 Stunden nach der Präparation der Zellen, als die ersten Acini adhärent waren. Es wurden Aufnahmen von einer Position in 15 min Abständen gemacht und mit der AxioVision Rel 4.8 Software von Zeiss ausgewertet.

3.2.5 Molekularbiologische Methoden:

3.2.5.1 DNA-Isolation:

Für die Genotypisierung von Mäusen der Linie TG(Ela1)/FVB 129 S4 (B6) wurde die DNA aus konfluent gewachsenen Zellpopulationen isoliert. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie bei der Subkultivierung pelletiert und bis zur weiteren Verwendung unter Verzicht auf Einfriermedium bei -80 °C gelagert. Die Isolation der DNA erfolgte nach Protokoll mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kit* der Firma Qiagen. Zunächst wurden die Zellpellets hierfür in 200 µl PBS resuspendiert und mit 20 µl Proteinase K zum Abbau von Proteinen im Zelllysat versetzt. Die Zellsuspension wurde mit 200 µl Lyse-Puffer AL versetzt und 10 min bei 56 °C inkubiert. Um die DNA auszufällen, wurden 200 µl Ethanol hinzugegeben und das Lysat auf eine QIAamp Säule überführt. Die gebundene DNA wurde anschließend gewaschen, wobei mit Puffer AW1 mit Hilfe von Guanidinsalzen Proteine, und mit Puffer AW2, auf Grund seines hohen Ethanol-Gehaltes, Salze entfernt wurden. Die Elution erfolgte mit 200 µl Puffer AE.

Für die Isolation der DNA aus ca. 2 mm großen Ohr-Biopsien wurden diese zunächst mit 180 µl Lyse-Puffer ATL und 20 µl Proteinase K versetzt und für 15 min bei 56 °C schüttelnd inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert war. Das Zelllysat wurde mit 200 µl Puffer AL

versetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert. Die anschließende Fällung der DNA und ihre weitere Isolation wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

3.2.5.2 Genotypisierung des Mausstammes TG(Ela1)/FVB 129 S4 (B6):

Für die Genotypisierung der transgenen Mäuse wurden 100 ng der aus konfluenten Zellen isolierten DNA bzw. 10 ng der aus Ohr-Biopsien gewonnenen DNA in einer PCR (polymerase chain reaction) amplifiziert und im Anschluss in einer Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Es wurden zwei verschiedene Primer-Mixe verwendet. Für die Ermittlung der zwischen zwei LoxP-Schnittstellen gelegenen Stopp-Sequenz und des LacZ-Gens wurde folgender Primer-Mix verwendet:

Primer-Mix	Konzentration	Pipettiervolumen
<i>Mutant reverse</i>	100 pmol/μl	10 μl
<i>Common</i>	100 pmol/μl	10 μl
<i>Wildtype reverse</i>	100 pmol/μl	10 μl
A. dest	-	170 μl

Für die Ermittlung der hinter einem Elastase1-Promotor gelegenen Rekombinase (cre) wurde folgender Primer-Mix eingesetzt:

Stocklösung	Konzentration	Pipettiervolumen
<i>Transgene forward</i>	100 pmol/μl	10 μl
<i>Transgene reverse</i>	100 pmol/μl	10 μl
<i>Internal Control forward</i>	100 pmol/μl	10 μl
<i>Internal Control reverse</i>	100 pmol/μl	10 μl
A. dest	-	160 μl

3. Material und Methoden:

Je Probe wurde folgender Ansatz pipettiert:

Stocklösung	Konzentration	Pipettiervolumen
10x Dream-Taq Puffer		2,4 µl
dNTPs	2 mM	2,4 µl
Primer-Mix	100 pmol/µl	2,4 µl
MgCl ₂	25 mM	1,73 µl
Dream Taq-Polymerase	5 U/µl	0,6 µl (1:5 verdünnt)
DNA		10/100 ng
A. dest		Ad 12 µl

Die PCR-Reaktion wurde in PCR-Gefäßen im *Mastercycler* nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung	94 °C	03:00 min	
Denaturierung	94 °C	00:30 min	↑ 35 x ↓
Hybridisierung	65/62 °C	01:00 min	
Polymerisierung	72 °C	01:00 min	
Polymerisierung	72 °C	02:00 min	
Abbruch/Lagerung	04 °C		

Die Hybridisierungstemperatur lag für den Nachweis der Cre-Rekombinase bei 65 °C, für den Nachweis der LoxP-Schnittstellen und des LacZ-Gens bei 62 °C. Für die Cre-Rekombinase wurde ein PCR-Produkt von 500 bp für ein transgenes Tier erwartet. Zusätzlich gab es hier eine interne Kontrolle mit einem Amplifikat von 200 bp. Für die LoxP-Schnittstellen und das LacZ-Gen gab es drei mögliche Ergebnisse: ein PCR-Produkt von 650 bp Länge wies auf ein Wildtyp-Tier hin, ein Produkt von 340 bp auf ein homozygoten Tier. Heterozygote Tiere ließen sich durch das Vorhandensein beider Amplifikate erkennen.

3.2.5.3 RNA-Isolation:

Für die Analyse der Genexpression adhärenter Zellen wurde die gesamte RNA aus einer konfluent gewachsenen Zellpopulation isoliert. Hierfür wurden die Zellen zunächst wie bei der Subkultivierung pelletiert und bis zur weiteren Verwendung unter Verzicht auf Einfriermedium bei -80 °C gelagert. Die automatisierte Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Plus Mini Kits* und des Nukleinsäureaufreinigungsroboters *QIAcube* der Firma Qiagen nach Herstellerangaben. Zuvor wurden die Zellen mit einem Lysispuffer (Buffer RLT Plus; enthält Guanidinsalze) und 1 % β -Mercaptoethanol versetzt und mit einer 20 G Kanüle aufgeschlossen. Das RNA-Isolationsverfahren des Kits beruht auf der Eliminierung von DNA und der Bindung der RNA an eine Silikat-Gel-Membran, von der diese nach einer Reihe von Waschschritten in 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert wird.

Die Isolation der RNA aus Pankreas-Gewebe für die Expressionsanalyse zum Zeitpunkt T0 erfolgte nach einem geänderten Protokoll, um die Degradation der RNA durch freigesetzte RNasen zu verhindern. Hierfür wurde das Pankreas vor der Exzision mit eisgekühltem *RNAlater*TM perfundiert, aus dem Organismus entfernt und bis zur weiteren Verarbeitung in 3 ml *RNAlater*TM auf Eis gelagert. Als nächstes wurde das Organ in kleinere Stücke von maximal 30 mg unterteilt und in kleinen Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auf diese Weise konnte das Pankreas bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden. Die Organstücke wurden nun mit Hilfe eines gekühlten Mikropistills zerkleinert, mit Lysispuffer und 1 % β -Mercaptoethanol versetzt und mit einer 20 G Kanüle aufgeschlossen. Die weitere Isolation wurde wie oben beschrieben mit Hilfe des Nukleinsäureaufreinigungsroboters *QIAcube* durchgeführt.

3.2.5.4 Konzentrationsbestimmung der RNA und DNA:

Zur Bestimmung der Konzentration und der Qualität der isolierten Nukleinsäuren wurde das Spektrophotometer NanoDrop 1000 verwendet. Mit Hilfe dieses Photometers kann in 2 µl einer Probe die Absorption bei 260 nm in zwei unterschiedlichen Laufstrecken (0,2 und 1 mm) gemessen werden. Bei dieser Wellenlänge haben Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Aus der so bestimmten optischen Dichte (OD) kann die Konzentration der Nukleinsäure berechnet werden. Zusätzlich dazu wird die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, bestimmt, um über das Verhältnis der OD260 zu OD280 Rückschlüsse auf die Reinheit der Probe ziehen zu können. Hierbei liegt der Wert für reine RNA bei $\geq 2,0$, der für reine DNA bei $\geq 1,8$.

3.2.5.5 Reverse Transkription:

Da in der weiteren Analyse keine RNA, sondern DNA eingesetzt wurde, musste die isolierte RNA zunächst in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurde das *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der Firma Qiagen verwendet. Um die Reinheit der RNA zu gewährleisten, wurde, wie auch in der Isolation, ein Schritt zum Verdau von gDNA eingefügt.

Der dafür benötigte Ansatz setzte sich aus:

2 µl gDNA-Verdaupuffer (gDNA Wipeout Buffer)

500 ng RNA (in 12 µl Wasser)

zusammen und wurde für zwei Minuten bei 42 °C im *Mastercycler* inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und mit folgendem Mastermix versetzt:

1 µl Reverse Transkriptase (Quantiscript)

4 µl RT-Puffer

1 µl Primer-Mix (inkl. Magnesium und Desoxyribunukleosidtriphosphaten, dNTPs).

Für eine hohe Ausbeute an cDNA aus allen Regionen der RNA wurde ein Mix aus Oligo-dTs und zufälligen Primern eingesetzt. Die reverse Transkription erfolgte für 30 Minuten bei 42 °C, woraufhin ein dreiminütiger 95 °C Schritt folgte, in dem die Reverse Transkriptase inaktiviert wurde. Zuletzt wurden die Proben mit 180 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.5.6 Quantitative Polymerase Kettenreaktion:

Mit Hilfe der quantitativen Polymerase Kettenreaktion konnte die relative Expression bestimmter Gene in Bezug auf ein Haushaltsgen (hier: β-Aktin) festgestellt werden.

Hierfür wurde die cDNA in Doppelansätzen in einer 96-Well-Platte im folgenden Reaktionsmix eingesetzt:

2,5 µl Primer-Mix (*QuantiTect Primer Assay*)

12,5 µl SYBR Green Master Mix (*QuantiFast SYBR Green PCR Kit*)

10 µl cDNA bzw. Wasser.

Zur Überprüfung der Primer-Spezifität und um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden Negativkontrollen durchgeführt, in denen die cDNA durch Wasser ersetzt wurde. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte im *Mastercycler ep Realplex²* der Firma Eppendorf. In einem ersten Schritt wurde hierbei der Reaktionsmix fünf Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Hotstart-Polymerase zu aktivieren. Nach einem Denaturierungsschritt, bei dem die DNA-Doppelhelix für 10 Sekunden aufgeschmolzen wurde, erfolgte bei 60 °C für 30 Sekunden das Primer-Annealing und die Amplifikation durch die *HotStarTaq Plus* DNA Polymerase. Dieser Ablauf von Denaturierung, Annealing und

3. Material und Methoden:

Elongation erfolgte für 42 Zyklen. Im Anschluss an jeden Zyklus konnte der Anstieg der Fluoreszenz detektiert werden. Anschließend wurde die Temperatur langsam über einen Zeitraum von 20 Minuten von 60 °C auf 95°C erhöht, um die spezifische Schmelztemperatur und damit die Fragmentlänge der DNA-Doppelstränge zu bestimmen (Abbildung 4).

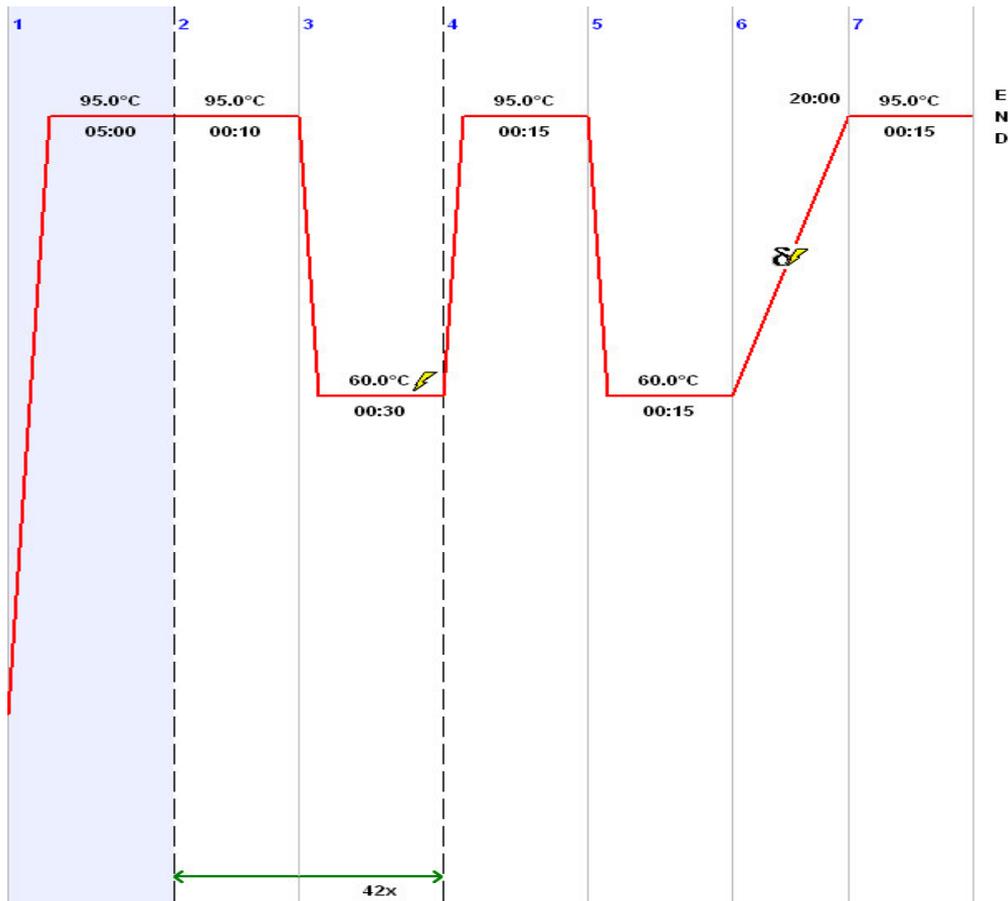


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Programms der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion. Zunächst wurde der Reaktionsmix für 5 min erwärmt, um die Hotstart-Polymerase zu aktivieren. Anschließend erfolgte ein Zyklus aus einer Denaturierung der DNA-Doppelhelix für 10 Sekunden und einem 30 Sekunden langem Schritt bestehend aus Primer-Annealing und Amplifikation. Am Anschluss an jeden Zyklus wurde der Anstieg der Fluoreszenz gemessen. Zuletzt wurde die Temperatur innerhalb von 20 Minuten kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erhöht um eine Schmelzkurve für jedes Produkt zu erstellen. Aus der erstellten Fluoreszenzkurve wurde über das Maximum der ersten Ableitung die spezifische Schmelztemperatur ermittelt.

Für die Auswertung der quantitativen PCR wurde mit Hilfe des CalQplex® Algorithmus der Schwellenwertzyklus (Ct = cycle threshold) für jede Amplifikationskurve berechnet. Über diesen Algorithmus wird das Maximum der zweiten Ableitung und somit der Wendepunkt

der PCR bestimmt. Für die Quantifizierung der relativen Expression wurde die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode angewandt. Hierbei wurde der Ct-Wert der Probe zunächst auf eine endogene Kontrolle, in diesem Fall das Haushaltsgen β -Aktin, normiert:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{(\text{Probe})} - \text{Ct}_{(\beta\text{-Aktin})}$$

Der ΔCt -Wert der Probe wurde ein weiteres Mal auf die Ausgangspopulation normiert:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Ausgangspopulation}}$$

Hieraus konnte im Anschluss die relative Expression berechnet werden:

$$E = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

3.2.5.7 Kapillargelelektrophorese:

Die Kapillargelelektrophorese wurde für die Bestimmung der Spezifität der PCR und für die Analyse der PCR-Produkte genutzt. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld durch eine Gelmatrix auf eine positive Ladung zuwandert und so auf Grund ihrer Größe aufgetrennt werden kann. In diesem Fall wurde die Gelelektrophorese in Kapillaren mit Hilfe des *QIAXcel DNA Screening Kits* durchgeführt, das analog zu einer herkömmlichen Agarosegelelektrophorese funktioniert.

Zunächst wurden die Proben bei 5 kV in die mit Polymergel gefüllten Kapillaren gezogen und anschließend bei 5 kV aufgetrennt. Das in dem Polymergel enthaltene Ethidiumbromid konnte in die DNA interkalieren und somit photometrisch detektiert werden. Zum Ausgleich von Unterschieden zwischen den einzelnen Kapillaren wurde ein Alignmentmarker bestehend aus 15 bp und 500 bp großen Fragmenten (*QIAXcel Alignment Marker 15 bp/500 bp*) für Produkte der Real-time PCR und aus 15 bp und 1 kbp großen Fragmenten (*QIAXcel Alignment Marker 15 bp/1 kbp*) für die Analyse der Genotypisierung eingesetzt und mit Hilfe der Software *BioCalculator 3.0* normalisiert. Die Größe der einzelnen Fragmente war durch den Einsatz der Größenstandards *QX DNA Size Marker pUC18/HaeIII* und *Qx DNA Size*

Marker 50 – 800 bp möglich. Die Ergebnisse der Elektrophorese wurden als Gelbild und als Elektropherogramm dargestellt.

3.2.5.8 Globale Genexpressionsanalyse:

Für die quantitative Analyse der gesamten Genexpression von murinen exokrinen Pankreaszellen wurde zunächst die mRNA aus Pankreasgewebe und Zellen der Passagen 0 bis 13 bei Konfluenz isoliert. Hierbei wurden ausschließlich Zellen und Gewebe von Tieren des Stammes FVB/NJ genutzt. Die weitere Behandlung der Proben und die *Microarray*-Analyse wurden von der Firma AROS Applied Biotechnology (Aarhus, Dänemark) durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst der Proben-RNA eine exogene eukaryotische Poly-A RNA Kontrolle als Sensitivitätsindikator für die Reaktionseffizienz der Markierung hinzugefügt (*Poly-A RNA Control Kit*). Als Nächstes wurde die RNA in einer T7-Polymerase basierten reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und die Template-RNA durch die RNase H abgebaut. Im Anschluss wurde die cDNA als Template für die T7-RNA-Polymerase-basierte Transkription der Antisense-cRNA eingesetzt. Nach einem Reinigungsschritt konnte die cRNA mit zufälligen Primern und dUTPs/dNTPs in cDNA umgeschrieben werden (*Ambion® WT Expression Kit*). Der zufällige Einbau von Uracil anstelle von Thymin wurde für die Fragmentierung der DNA genutzt: die Uracil DNA Glycosylase (UDG) erkennt Uracil-Moleküle in der DNA und entfernt diese durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung. Ein zweites Enzym, die Apurine/Apyrimidine Endonuklease 1 (APE1), erkennt Bereiche der DNA, die keine Purin- bzw. Pyrimidin-Basen enthalten, schneidet an diesen Stellen das Phosphodiester-Rückgrat der DNA und hinterlässt einen 3'-Hydroxy- und einen 5'-Deoxyribosephosphat-Terminus (*WT terminal Labeling Kit*). Die terminale Markierung erfolgte durch Biotin Allonamid Triphosphat, welches mit Hilfe der terminalen Deoxyribonukleotidyltransferase (TdT) an das 3'-terminale Ende der DNA-Fragmente gebunden wurde.

3. Material und Methoden:

Die markierten DNA-Fragmente, sowie Hybridisierungskontrollen wurden an die Oligonukleotid-Proben des Chips (Mouse Gene 1.1 ST Array Plate) gebunden, denaturiert, gewaschen und mittels Streptavidin gefärbt (*Ambion® WT Expression Kit*). Der Chip wurde mit einem GeneTitan® Multi-Channel Instrument photometrisch ausgelesen.

Für die Normalisierung der Daten wurden die Werte aller Proben mit Hilfe einer Quantilnormalisierung aneinander angeglichen, so dass die Histogramme aller Experimente gleich waren (Anhang: Abbildung 1).

Die statistische Signifikanz der Experimente wurde für die Proben T0 (Gewebe) und P0 mit Hilfe eines Zweistichproben T-tests mit ungleichen Varianzen ermittelt und die erhaltenen p-Werte mit der Bonferroni-Methode korrigiert. Als signifikant differenziell exprimiert wurden Gene gewertet, deren Fc-Wert (Fold Change) > 2 bzw. $< 0,5$ und deren probability value (p-Wert) $< 0,05$ war. Die Fc-Werte wurden wie folgt ermittelt: $Fc = 2^{X_{\text{Gewebe}} - X_{\text{P0}}}$, wobei X_{Gewebe} und X_{P0} die relative Expression des Gens im Gewebe und am Ende der Passage 0 darstellten.

Des Weiteren wurden ein hierarchisches Clustering auf der Basis aller Gene und eine Hauptkomponentenanalyse, bei der die Varianz aller Gene in drei Hauptvarianzen zerlegt wurde, durchgeführt.

Die Berechnung und graphische Darstellung der Expressionsänderung wurde mit dem Programm Igor Pro durchgeführt. Mit Hilfe von GoMiner, einem Programm der Genomics and Bioinformatic Group of LMP, NCI und NIH wurden die differenziell exprimierten Gene nach ihren Einträgen in der *Gene Ontology Datenbank* sortiert und einzelnen Kategorien zugeordnet. Diese Zuordnung geschieht über die HUGO-Namen (*Human Genome Organisation*) der Gene.

3.2.6 Proteinbiochemische Methoden:

3.2.6.1 X-Gal-Test:

Der Nachweis einer funktionellen β -Galaktosidase in Zellen aus transgenen Mäusen erfolgte mit Hilfe des X-Gal-Tests. Hierbei wird der β -Galactosidase 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal) als Substrat angeboten und von dieser zu Galaktose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl hydrolysiert. Das entstandene Produkt oxidiert mit Sauerstoff zu dem tiefblauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo der mikroskopisch nachgewiesen werden kann (Abbildung 5).

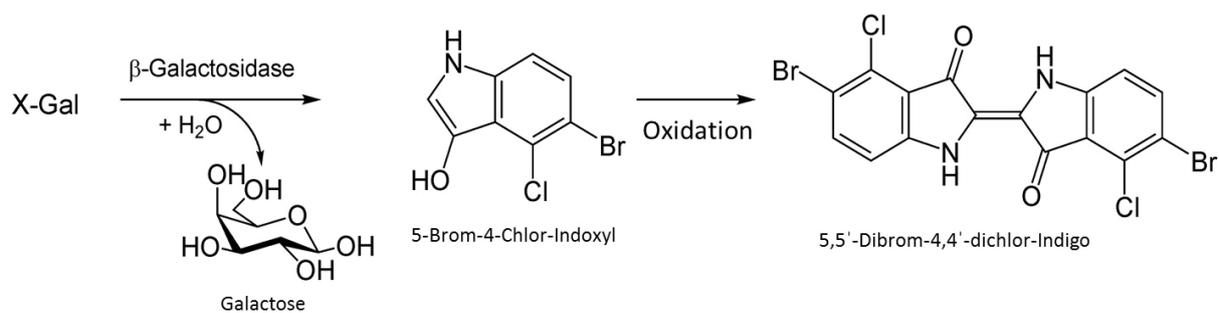


Abbildung 5: Enzymatische Spaltung von X-Gal. X-Gal wird durch die β -Galactosidase und Oxidation des entstehenden Produktes zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-Indigo. Veränderte Abbildung nach de.academic.ru.

Hierfür wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit X-Gal Fixierungspuffer fixiert, gewaschen und für bis zu 24 Stunden bei 37 °C mit dem X-Gal Färbepuffer inkubiert. Anschließend konnte der Färbepuffer entfernt, die Zellen mit Vectashield eingedeckt und mikroskopisch ausgewertet werden.

3.2.6.2 Immuncytochemie:

Die Proteinexpression der untersuchten Zellen wurde, direkt nach der Präparation in einer Cytospin (T0) und in den Passagen 0 und 5, durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Hierbei wurden spezifische, nicht markierte Primärantikörper und gegen die Primärantikörper gerichtete, mit Fluorophoren markierte Sekundärantikörper verwendet.

Zunächst wurden die Zellen je nach Antikörper mit Methanol/Aceton oder Paraformaldehyd fixiert. Nach dreimaligem Spülen mit PBS wurden zur Abdeckung der unspezifischen Bindungen die Zellen mit 1,65 % Ziegennormalserum für 20 min inkubiert. Die Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die ungebundenen Antikörper wurden mit PBS entfernt und es folgte eine Inkubation mit einem sekundären Antikörper für 60 min bei 37 °C. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Zellen gewässert, mit Vectashield eingedeckt und mikroskopiert werden. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl und der Anzahl an positiven Zellen erfolgte mit ImageJ.

3.2.6.3 Click-iT® Proliferationsassay:

Der Click-iT® EdU Zellproliferationsassay wurde genutzt, um die Proliferationsraten von Zellen unter variierenden Serumkonzentrationen zu bestimmen. Dieser Assay wird alternativ zu einer Markierung mit BrdU eingesetzt. EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridin) ist ein Nukleosid-Analogon von Thymin, das während der DNA-Synthese in die DNA inkorporiert wird. Die Detektion basiert auf der Reaktion zwischen dem Farbstoff Picolylazid und EdU, welches Alkine enthält. Die geringe Größe des Picolylazids erlaubt die kovalente Bindung ohne eine vorherige DNA-Denaturierung.

Das Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt: die Zellen wurden unter verschiedenen Serumkonzentrationen mit 10 µM EdU kultiviert, bis die ersten Proben Konfluenz erreichten. Die Fixierung erfolgte für 15 min bei Raumtemperatur mit Methanol / Aceton (7:3). Anschließend wurden die Zellen zwei Mal mit 1 % BSA in PBS gewaschen und 30 min mit folgendem Reaktionsmix inkubiert:

3. Material und Methoden:

438 μ l 1 x Click-iT Reaktionspuffer

10 μ l Kupfersulfat

2,5 μ l Alexa Fluor Picolylazid

50 μ l 1 x Reaktionspufferzusatz

Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl wurden die Zellkerne mit DAPI gegengefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit Vectashield eingedeckt und mikroskopisch analysiert.

Die Gesamtzellzahl und die Zahl der EdU-positiven Zellen wurden mit Hilfe der ImageJ Software bestimmt.

4. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Übergang von Zellen aus dem Gewebe in die Zellkultur untersucht. Hierbei sollten einige grundlegende Fragen geklärt werden: Was passiert mit Zellen, wenn sie aus dem Gewebsverband herausgenommen und zweidimensional *in vitro* kultiviert werden? Welchen Einfluss hat die Inkulturnahme von Zellen auf ihre Gen- und Proteinexpression? Wie schnell geht die Anpassung an die veränderten Umgebungsbedingungen vonstatten? Und werden Zellen durch die Kultivierung instruiert, einen plastischeren Zustand anzunehmen, oder findet eine *Selektion* von seltenen Stammzellen statt, die die differenzierten Zellen überwachsen?

4.1 Globale Genexpressionsanalyse

Zunächst wurde in einer globalen Genexpressionsanalyse überprüft, wie sich der Verlust der Gewebeintegrität und die *in vitro*-Kultivierung auf die Genexpression von Zellen auswirken.

Die Genexpressionsanalyse wurde für murine Pankreaszellen durchgeführt, wobei acht Gewebeproben aus zwei Wildtyp-Mäusen mit je drei Zelllinien aus den Passagen 0 bis 13 verglichen wurden. Für jede Probe wurde die Expression von mehr als 28.000 codierenden Transkripten und über 7.000 nicht codierenden intergenen Transkripten analysiert.

Vor der weiteren Verarbeitung wurden die *Microarray*-Daten zunächst normalisiert (Anhang: Abbildung 1), die statistische Signifikanz mit Hilfe eines T-Tests ermittelt, ein hierarchisches Clustering und eine Hauptkomponentenanalyse durchgeführt.

Sowohl das hierarchische Clustering, als auch die Hauptkomponentenanalyse zeigten, dass sich die Genexpression der untersuchten Zellen durch die Inkulturnahme stark änderte. Am stärksten unterschied sich das Expressionsmuster des Gewebes von dem der kultivierten Zelllinien, während sich die Expression im Verlauf der Kultivierung kaum veränderte (Abbildung 6).

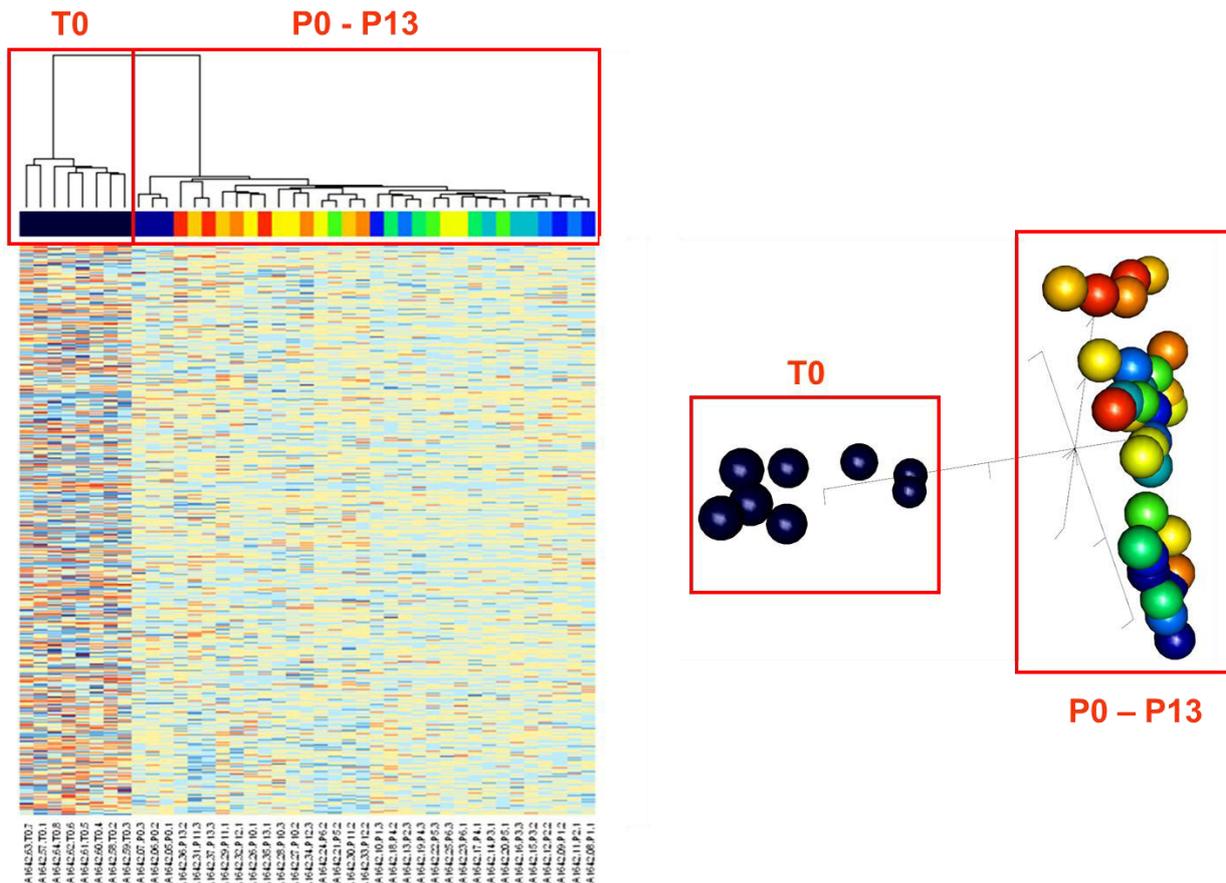


Abbildung 6: Globale Genexpressionsanalyse. A: Hierarchisches Clustering aller Proben; die farblich markierten Replikate der Proben sind auf Grundlage ihrer Verwandtschaftsverhältnisse zueinander sortiert. Dabei stellt jede Spalte eine der untersuchten Proben, jede Zeile eines der untersuchten Gene dar. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden aufgrund der gesamten Genexpression der jeweiligen Proben ermittelt. Die Genexpression des Gewebes (T0, schwarz) unterscheidet sich drastisch von der der kultivierten Zellen (Farbskala: Gelb- bis Blautöne). Die kultivierten Zellen sind untereinander näher verwandt, als mit dem pankreatischen Gewebe. **B:** Darstellung der Hauptkomponentenanalyse; die Verwandtschaftsverhältnisse der Proben zueinander sind dreidimensional im Raum dargestellt. Es wird deutlich, dass die kultivierten Zellen untereinander eine größere Ähnlichkeit aufweisen, als zu den Proben aus dem Gewebe.

Um die Frage zu klären, wie schnell die Zellen ihre Genexpression an die veränderten Umgebungsbedingungen anpassen und wie sich die Expression über die Dauer der Kultivierung ändert, wurde die Expressionsänderung von einer Passage zur jeweils nächsten berechnet. Hierbei wurde eine drastische Veränderung der Genexpression in den Zellen direkt nach der Inkulturnahme (Passage 0 - Gewebe (T0)) deutlich. Zwischen den Passagen 0 und 1 gab es eine moderate Änderung der Genexpression, während in den folgenden Passagen die Expression der Zellpopulation weitestgehend stabil blieb (Abbildung 7).

4. Ergebnisse

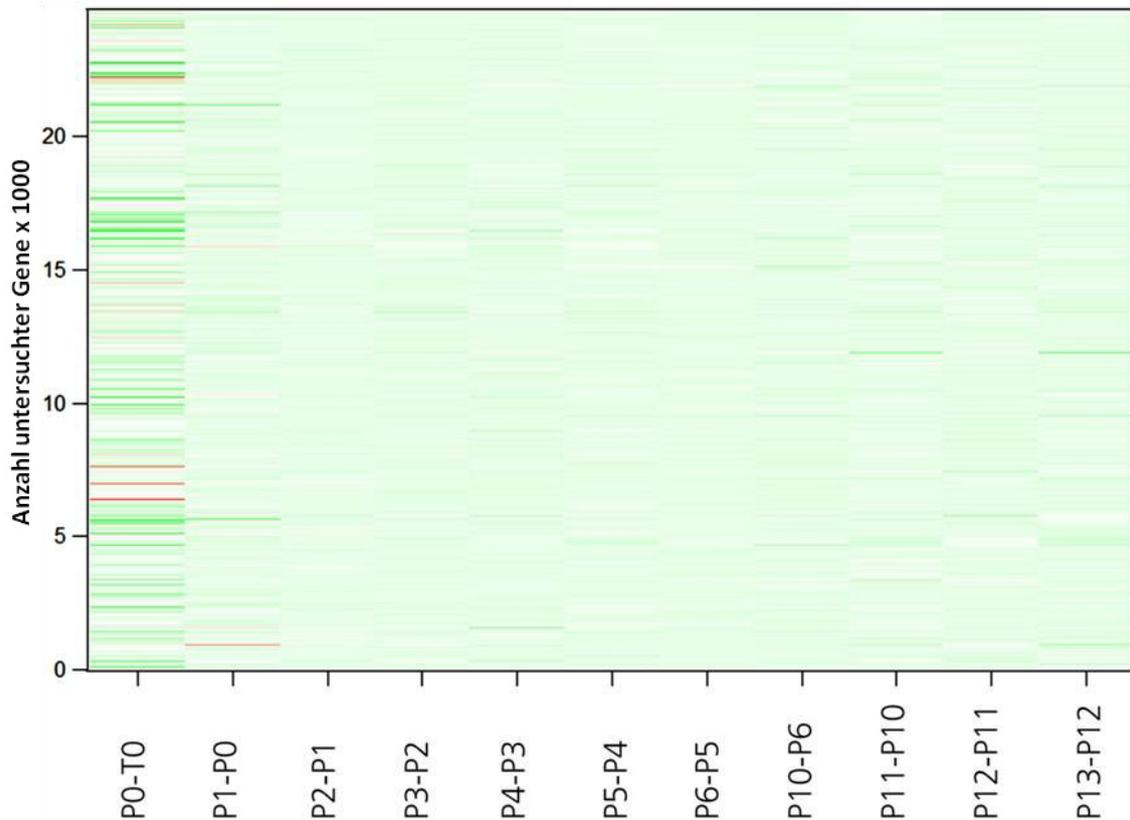


Abbildung 7: Änderung der Genexpression muriner Pankreaszellen. *Heatmap* der differentiellen Genexpression zwischen Gewebe (T0) und den Passagen 0-13. T0: n=8, P0-P13: n=3. Herunter regulierte Gene sind in rot dargestellt, hoch regulierte Gene in grün. Weiße Banden stehen für eine unveränderte Genexpression. Es wird deutlich, dass die Expressionsänderung zwischen Gewebe und Passage 0 stärker ausfällt, als zwischen den übrigen Passagen.

Durch die Berechnung der Expressionsänderung zwischen den Passagen wird deutlich, dass die Anpassung der Zellen an eine veränderte Umwelt sehr schnell vonstattengeht und schon vor der ersten Subkultivierung weitestgehend abgeschlossen ist, wohingegen im weiteren Kulturverlauf nur noch eine schwache Regulation einzelner Gene erkennbar ist. Zudem gibt die rasante Veränderung der Genexpression der Zellpopulation einen ersten Hinweis darauf, dass eine *Instruktion* der Zellen stattfindet, einen plastischeren Zustand anzunehmen. Bei einer *Selektion* einzelner Stammzellen aus dem Pankreas, die die restliche Zellpopulation durch ihren proliferativen Vorteil überwachsen, wäre dagegen eine langsame, aber stetige Änderung der Genexpression, die ihr Maximum nach einigen Passagen erreicht, zu erwarten.

Im Folgenden wird nun, da die Genexpression sehr schnell nach der Inkulturnahme umgestellt wurde, nur noch der Übergang von Zellen aus dem Gewebe in die Zellkultur bis zum Ende der Passage 0 betrachtet. In diesem Zeitraum konnten 879 signifikant differentiell

4. Ergebnisse

hoch regulierte ($p \leq 0,05$; $F_c \geq 2$) und 594 signifikant herunter regulierte ($p \leq 0,05$; $F_c \leq 0,5$) Gene identifiziert werden. Die Chip-Analyse zeigte, dass durch die *in vitro*-Kultur besonders viele Gene herunter reguliert wurden, die für die Pankreasidentität notwendig sind, wie beispielsweise PDX1 und GATA4, die in der frühen Pankreasentwicklung aktiv sind (Yee, Yusuff et al. 2001; Carrasco, Delgado et al. 2012). Des Weiteren wurde die Expression vieler Gene herunter reguliert, die für die Pankreasfunktion verantwortlich sind, wie Lipasen und Proteasen, die in diesem Organ synthetisiert werden (Abbildung 8, Anhang: Tabelle 1 und 2).

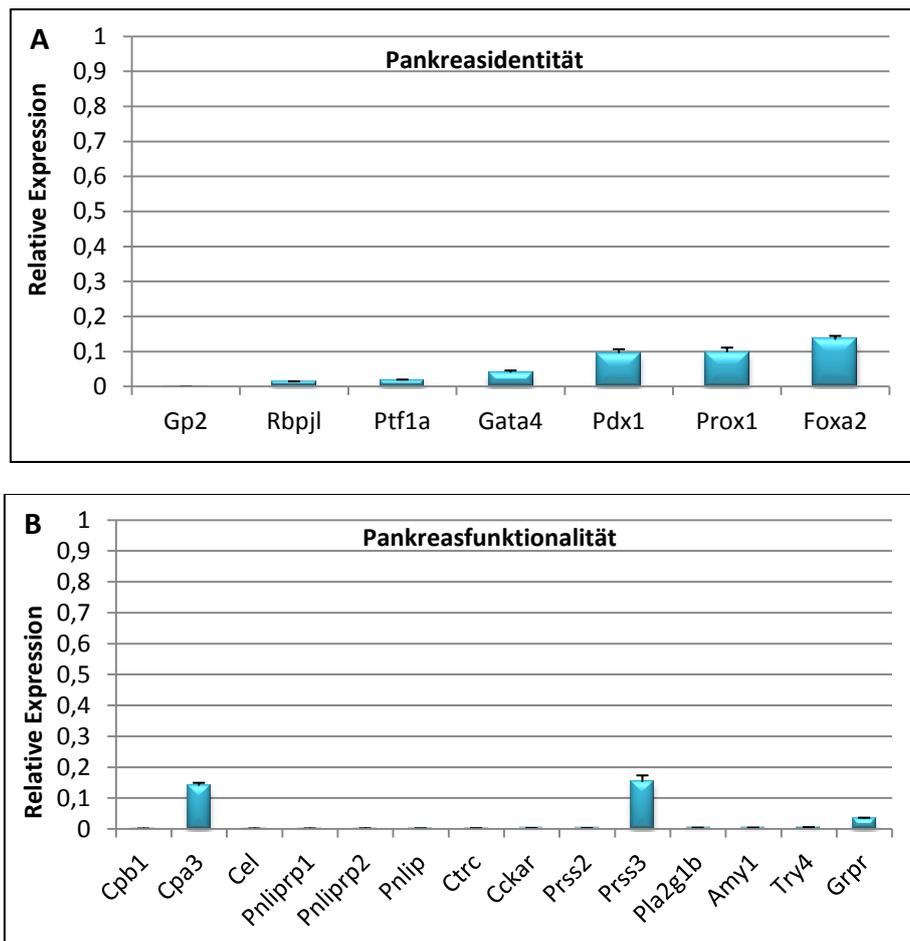


Abbildung 8: Differenzielle Expression von Genen in Passage 0, die die pankreatische Identität (A) und Funktionalität (B) bestimmen. Die jeweilige Genexpression ist auf die Expression im Gewebe (rel. Expression = 1) bezogen. Alle untersuchten Gene wurden nach der Inkulturnahme stark herunter reguliert. $n = 3$, SEM.

Um herauszufinden, in welchen Bereichen Gene differenziell exprimiert wurden und ob diese Regulation durch bestimmte physiologische Prozesse, wie z.B. eine Immunantwort, hervorgerufen wurde, wurden die differenziell exprimierten Gene mit Hilfe des Programmes

4. Ergebnisse

GoMiner unterschiedlichen Kategorien biologischer Prozesse zugeordnet und miteinander verglichen (Abbildung 9).

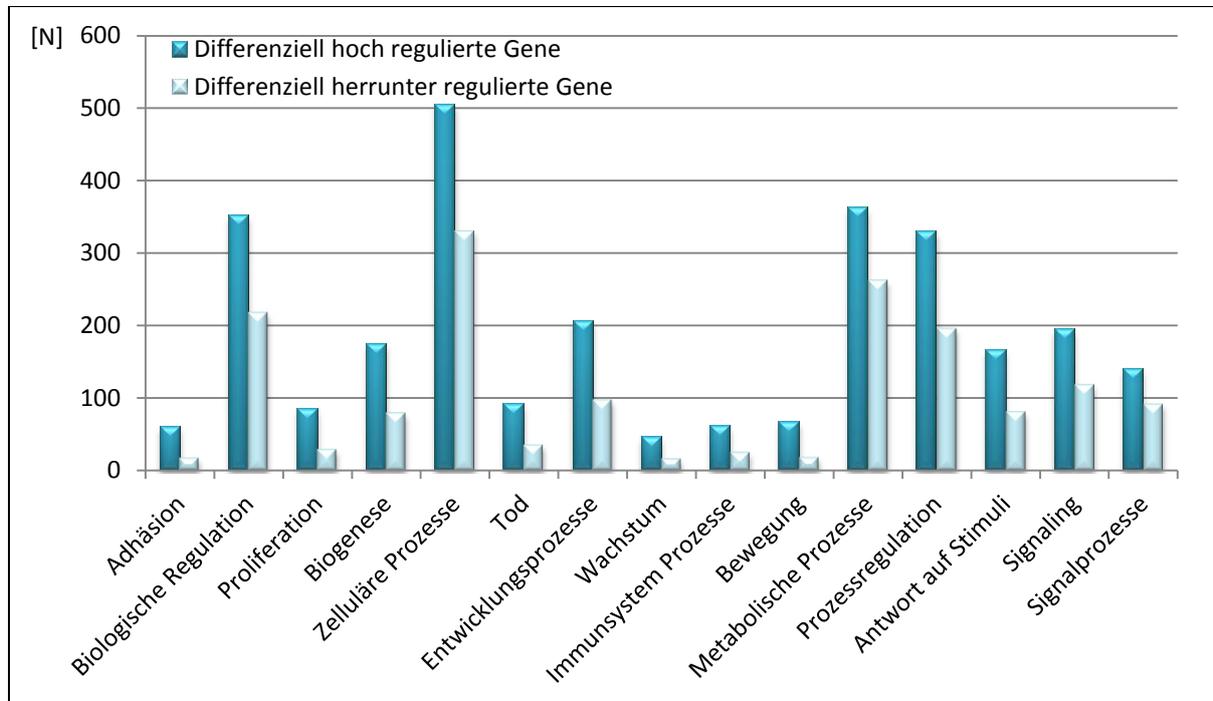


Abbildung 9: GoMiner-Kategorien biologischer Prozesse. Vergleich der differenziell hoch bzw. herunter regulierten Gene. N = Anzahl der differenziell exprimierten Gene.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass in vielen biologischen Prozessen, wie einer Immunreaktion, Signalprozessen oder einer Antwort auf Stimuli, sowohl Gene hoch, als auch herunter reguliert wurden. Den Prozessen, die bei der Inkulturnahme von exokrinen Pankreaszellen ablaufen, konnte also keine eindeutige physiologische Funktion zugewiesen werden. Die Zellen schienen sich eher unterschiedlicher Mechanismen diverser physiologischer Prozesse zu bedienen, um eine Anpassung an die Zellkultur zu gewährleisten.

Um einen weiteren Einblick in den zeitlichen Ablauf der Anpassung an die Zellkultur zu bekommen, wurden die Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalyse zunächst in einer quantitativen Real-Time PCR für 15 verschiedene Gene verifiziert (Anhang: Abbildung 2-4, Tabelle 3 und 4) und im Anschluss für frühere Zeitpunkte der Kultivierung wiederholt (Abbildung 10, Abbildung 11, Anhang: Tabelle 5). Hierbei wurden zum einen Gene ausgewählt, die spezifisch für die Pankreasfunktionalität sind, wie Amy1 und Try4, die die Verdauungsenzyme Amylase und Trypsin codieren (Schibler, Tosi et al. 1980; Szmola, Kukor

et al. 2003). Daneben wurden Gene ausgewählt, die spezifisch für die pankreatische Identität sind, wie GATA4, ein Transkriptionsfaktor, der von Progenitorzellen des Pankreas gebildet wird (Carrasco, Delgado et al. 2012), oder GP2, welches das Hauptmembranprotein der acinären Zymogengranula darstellt (Yu, Michie et al. 2004).

Zum anderen wurde die Expression von Genen betrachtet, die in der globalen Genexpressionsanalyse eine besonders starke differenzielle Expression zeigten. Hierzu zählten Interleukin 6, das am stärksten hochregulierte Gen, welches auf eine Beteiligung an einer frühen Immunantwort in einer Entzündungsreaktion hinweisen könnte (Heinrich, Behrmann et al. 2003), sowie die Wachstumsfaktoren CTGF und FGF7. Col8a1, Col12a1 und TIMP1, die an der Kollagensynthese und der Umgestaltung der Extrazellulären Matrix beteiligt und somit notwendig für die Anpassung an die Zellkultur sind (Gordon and Olsen 1990; Shuttleworth 1997; Lambert, Dasse et al. 2004). Des Weiteren wurde die Expression von WISP1 untersucht, welches durch den Wnt-Signalweg induziert wird und zur Expression von Kollagenen und Matrix-Metalloproteasen führt (Xu, Corcoran et al. 2000). Das von glatter Muskulatur exprimierte Gen ACTA2 (α -SMA) wurde als Marker für eine mesodermale Entwicklung gewählt (Skalli, Ropraz et al. 1986). Die am stärksten differenziell exprimierten Transkriptionsfaktoren HMGA2 und FOSL1 wurden ebenfalls untersucht. Schließlich wurde RIPK3 als ein Indikator für Nekrose ausgewählt (Moujalled, Cook et al. 2013). Die Expression der Gene wurde jeweils auf die Expression im Gewebe, also vor der Inkulturnahme bezogen.

Die Ergebnisse des *Microarrays* deckten sich weitestgehend mit denen der quantitativen Real-Time PCR (Anhang: Abbildung 2-19). In beiden Untersuchungen konnte eine Expressionsabnahme der pankreasspezifischen Gene und ein genereller Anstieg beinahe aller weiteren untersuchten Gene gezeigt werden. Die Expressionsmuster der Gene Col8a1, FOSL1, IL-6 und WISP1 unterschieden sich jedoch von denen der globalen Genexpressionsanalyse. Für diese Gene konnte kein Anstieg der Genexpression, oder ein schnellerer Abfall der Genaktivität nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür ist die Tatsache, dass die Expression dieser Gene in der quantitativen PCR im Gewebe nicht nachgewiesen werden konnte, so dass sich alle weiteren Daten auf höhere Passagen bezogen, wodurch die Änderung der Genexpression weniger hoch ausfiel. Insgesamt konnte aber für alle Gene eine

4. Ergebnisse

tendenziell vergleichbare Genexpressionsänderung wie in der *Microarray*-Analyse gezeigt werden.

Überraschend waren die Ergebnisse der quantitativen PCR für frühere Zeitpunkte der Kultivierung. Bereits in der globalen Genexpressionsanalyse war eine schnelle Anpassung der Genexpression an die Kultivierungsbedingungen sichtbar geworden. Durch die Analyse der Expression nach 24, 48 und 72 Stunden wurde allerdings deutlich, dass diese Anpassung viel schneller vonstattengeht, als bisher angenommen. So verloren die untersuchten exokrinen Pankreaszellen schon 24 Stunden nach der Inkulturnahme ihre pankreatische Funktion und Identität (Abbildung 10, Anhang: Abbildung 5-8).

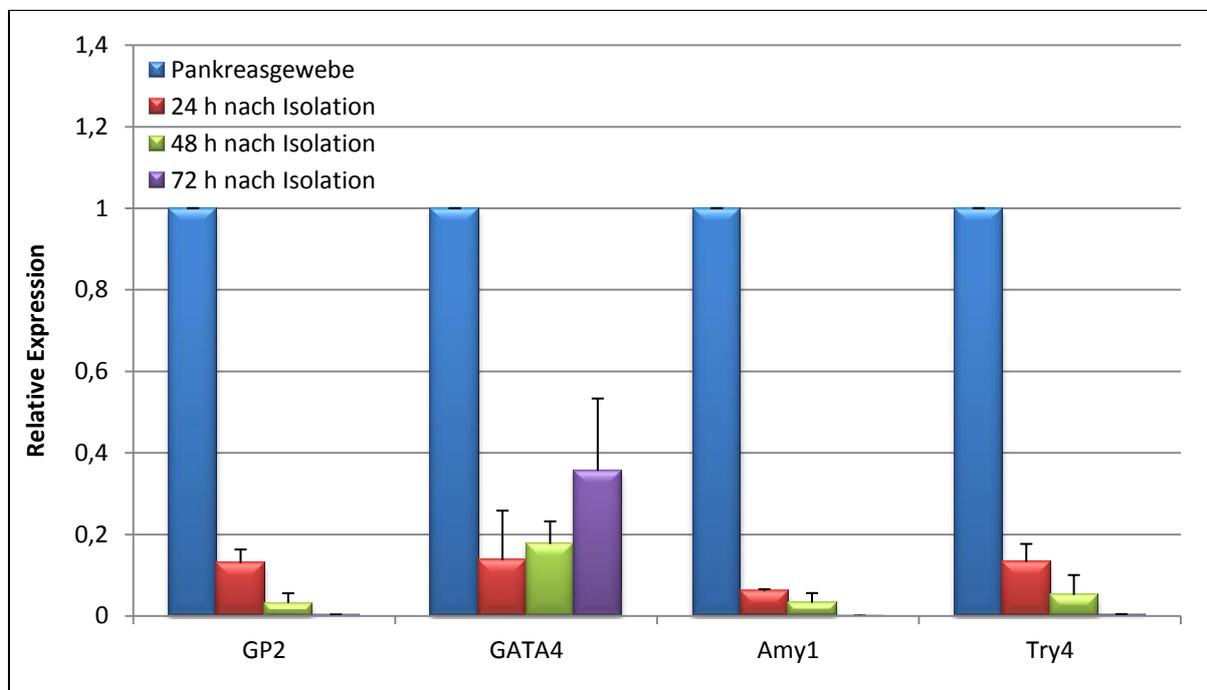


Abbildung 10: Vergleich der relativen Expression pankreasspezifischer Gene im Gewebe (n=2) und wenige Stunden nach der Inkulturnahme. 24, 48 und 72 h in Kultur. Alle untersuchten Gene wurden durch die Inkulturnahme stark herunter reguliert. n = 3, SEM.

Auch bei den hoch regulierten Genen konnten nach 24 Stunden schon signifikante Expressionsänderungen gezeigt werden (Abbildung 11). Während die Expression des Gens IL-6 durch die Inkulturnahme überhaupt erst induziert wurden, konnten eine Verdopplung bzw. eine sechsfache Expression von CTGF und RIPK3 gezeigt werden. Den drastischsten Expressionsanstieg zeigten die Gene TIMP1 und HMGA2, die auf ein 11,5-faches bzw. ein 22-faches anstiegen.

4. Ergebnisse

Während die Gene Col12a1 und FGF7 bereits nach 48 Stunden einen signifikanten Expressionsanstieg zeigten und FOSL1 und WISP1 zu diesem Zeitpunkt erstmalig exprimiert wurden, konnten eine signifikante Änderung der Expression der Gene Col8a1 und ACTA2 erst am Ende der Passage 0 gezeigt werden.

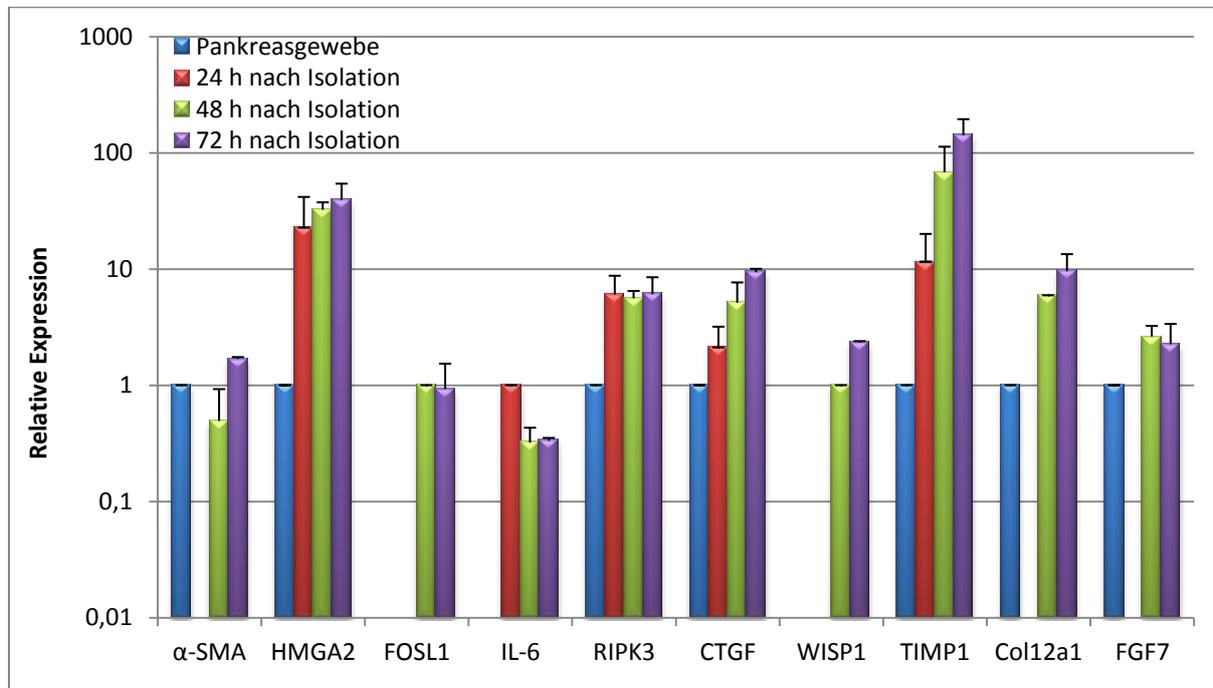


Abbildung 11: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene im Gewebe (n=2) und wenige Stunden nach der Inkulturnahme. 24, 48 und 72 h in Kultur. Die Expression der Gene HMGA2, IL-6, RIPK3, CTGF und TIMP1 wurde bereits nach 24 Stunden signifikant hoch reguliert. Nach 48 Stunden stieg die Expression der Gene FOSL1, WISP1, Col12a1 und FGF7. Die Expression der Gene FOSL1, IL-6 und WISP1 wurde erst durch die Inkulturnahme induziert. Für das Gen ACTA2 konnte in den ersten 72 Stunden keine Steigerung der Genexpression gezeigt werden. n = 3, SEM.

Insgesamt konnte demnach gezeigt werden, dass sich die Genexpression von exokrinen Zellen durch die Inkulturnahme dramatisch ändert. Diese Veränderungen treten bereits nach 24 Stunden der Kultivierung auf, im weiteren Verlauf der Kultivierung bleibt die Genexpression der Zellpopulation jedoch weitestgehend stabil. Die Zellen verlieren durch die Inkulturnahme ihren ursprünglichen Phänotyp und zeigen eine Regulation der Genexpression von Gene aus den unterschiedlichsten biologischen Bereichen, wobei sich keine Wiederholung organischer Prozesse erkennen lässt.

4.2 Untersuchungen zur Herkunft und Charakterisierung der stammzellartigen Zellpopulation

Um das Schicksal der terminal differenzierten exokrinen Pankreaszellen nach der Isolation aus dem Gewebe zu verfolgen, wurde die entstehende Zellpopulation auf RNA- und Proteinebene charakterisiert. Des Weiteren wurde untersucht, ob die resultierende stammzellartige Zellpopulation durch *Selektion* einzelner proliferativer Stammzellen, oder durch *Instruktion* aller differenzierten Zellen, einen plastischeren Zustand anzunehmen, entstanden ist. Für diese Untersuchungen wurde ein Mausstamm eingesetzt, dessen exokrine Pankreaszellen mit Hilfe eines Reportersystems stabil markiert waren.

4.2.1 Charakterisierung der Zellpopulation

Zunächst wurden die aus murinen Pankreata gewonnenen Zellen charakterisiert. Hierfür wurde eine Zeitrafferaufnahme der Acini während der ersten sieben Tage in Kultur angefertigt (Abbildung 12). Es konnte beobachtet werden, dass die kultivierten Acini (Abbildung 12, Pfeil, 2 Tage) zunächst an der Zellkulturoberfläche adhärten und nach zwei Tagen und zehn Stunden erste Zellen die basale Membran des Acinus durchbrachen. Im Laufe der Kultivierung wuchsen nach und nach alle Zellen aus dem Acinus aus und bildeten einen zweidimensionalen Zellrasen. Dies deckte sich mit den Untersuchungen von Rapoport et al. (Rapoport, Schickanz et al. 2009) und zeigte, dass nicht nur einzelne, stammzellartige Zellen in der Lage sind, zu adhärten und aus sich die entstehende Zellpopulation hervorgehen zu lassen, sondern dass terminal differenzierte Zellen einen großen Teil der Population zum Ende der Passage 0 ausmachen. Zusammen mit der Tatsache, dass die kultivierten Zellen ihre Genexpression innerhalb der ersten 24 Stunden umzustellen beginnen, spricht diese Beobachtung dafür, dass ein grundlegender Teil der untersuchten Zellpopulation durch *Instruktion* differenzierter Zellen entstanden sein muss.

4. Ergebnisse

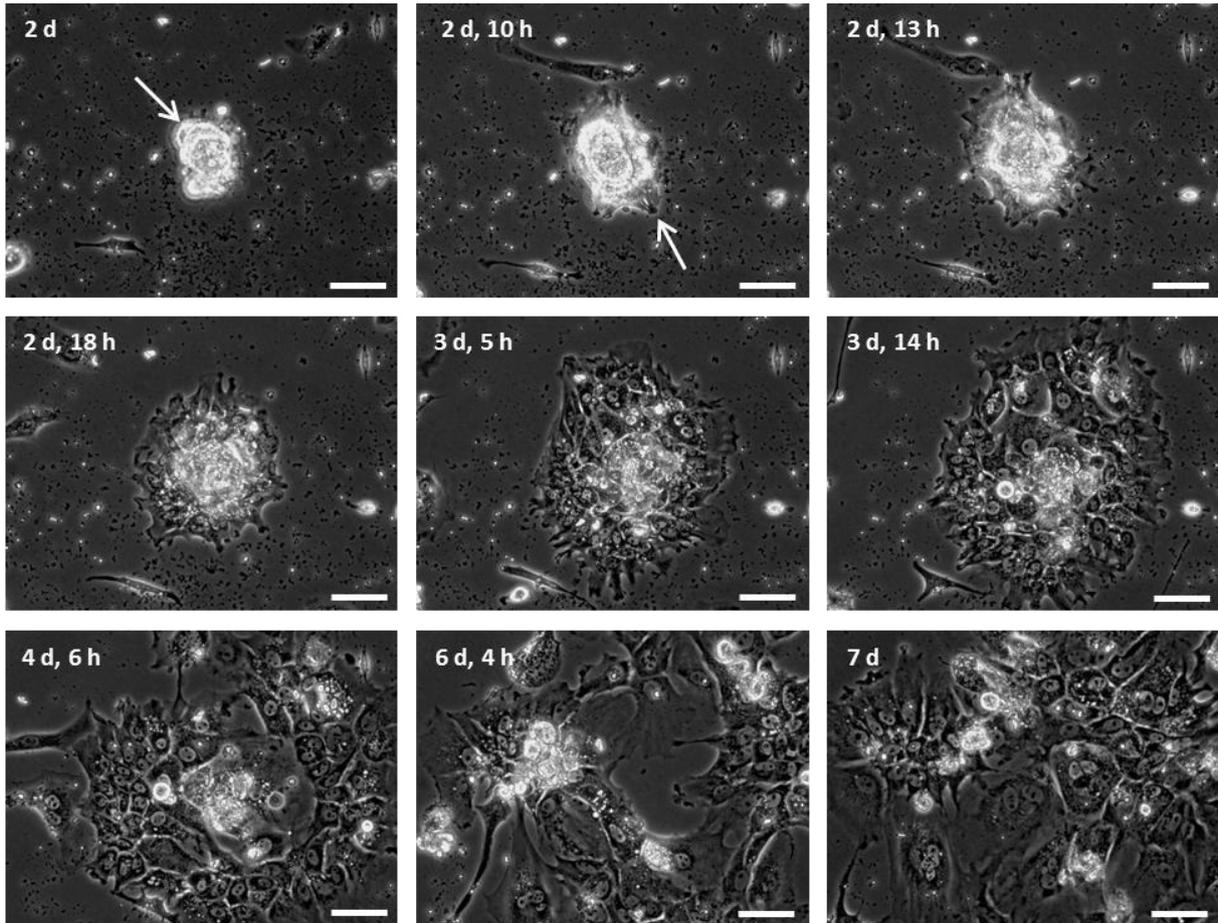


Abbildung 12: Time-lapse exokriner muriner Pankreaszellen. Adhärenzen und Auswachsen eines Acinus. Über einen Zeitraum von 5 Tagen wurde alle 15 min Aufnahmen gemacht. Hierbei ließ sich erkennen, dass die Acini zunächst an die Zellkulturoberfläche adhärten, die acinären Zellen die basale Membran des Acinus durchbrachen und aus ihm heraus wanderten. Die exokrinen Zellen stellen nach 7 Tagen der Kultivierung einen großen Teil der Zellpopulation. 2 d: Pfeil = Acinus; 2 d, 10 h: Pfeil = auswachsende Zelle. d = Tag, h = Stunde. Maßstab: 100 μm .

Um die Expression unterschiedlicher Proteine in den Zellen während der Kultivierung zu ermitteln, wurden quantitative PCR und Immunfluoreszenz-Färbungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt.

Die quantitative PCR wurde für murines Pankreasgewebe und für kultivierte exokrine Zellen bis zur fünften Passage durchgeführt. Es wurden sowohl pankreasspezifische Gene wie PDX1 und Amylase (Schibler, Tosi et al. 1980; Yee, Yusuff et al. 2001), als auch Marker anderer Keimblätter untersucht. Für eine ektodermale Differenzierung wurden die kurzen, mittleren und langen Ketten von Neurofilamenten untersucht (Yuan, Rao et al. 2012), als mesodermaler Marker wurde α -SMA genutzt (Skalli, Ropraz et al. 1986). Zudem wurden Nestin und Oct-4 als Marker für Stammzellen (Rosner, Vigano et al. 1990; Wiese, Rolletschek et al. 2004) und KLF4 als Pluripotenzmarker eingesetzt (Takahashi and Yamanaka 2006).

4. Ergebnisse

Die Proliferation wurde mit Hilfe von Ki67 bestimmt (Urruticoechea, Smith et al. 2005) (Abbildung 13, Anhang: Tabelle 6, Abbildung 20 - 29).

Wie auch schon in vorherigen Untersuchungen gezeigt, stellten die exokrinen Zellen in der *in vitro*-Kultur die Synthese von pankreasspezifischen Markern, wie Amylase und PDX1, ein und verloren ihren pankreatischen Phänotyp. Die Expression von ektodermalen Markern konnte nur in der Passage 0 nachgewiesen werden, in der sowohl leichte, als auch mittlere Ketten, aber keine schweren Ketten von Neurofilamenten exprimiert wurden. Die Expression des mesodermalen Markers α -SMA stieg nach der Inkulturnahme drastisch an und konnte in allen untersuchten Passagen in unterschiedlich starker Ausprägung nachgewiesen werden. Während die Expression des Stammzellmarkers Nestin ab der Passage 1 signifikant reduziert wurde, konnte Oct-4 in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Auch die Expression von KLF4 wurde mit der Inkulturnahme drastisch reduziert. Die Expression von Ki67 sank ab der 5. Passage signifikant.

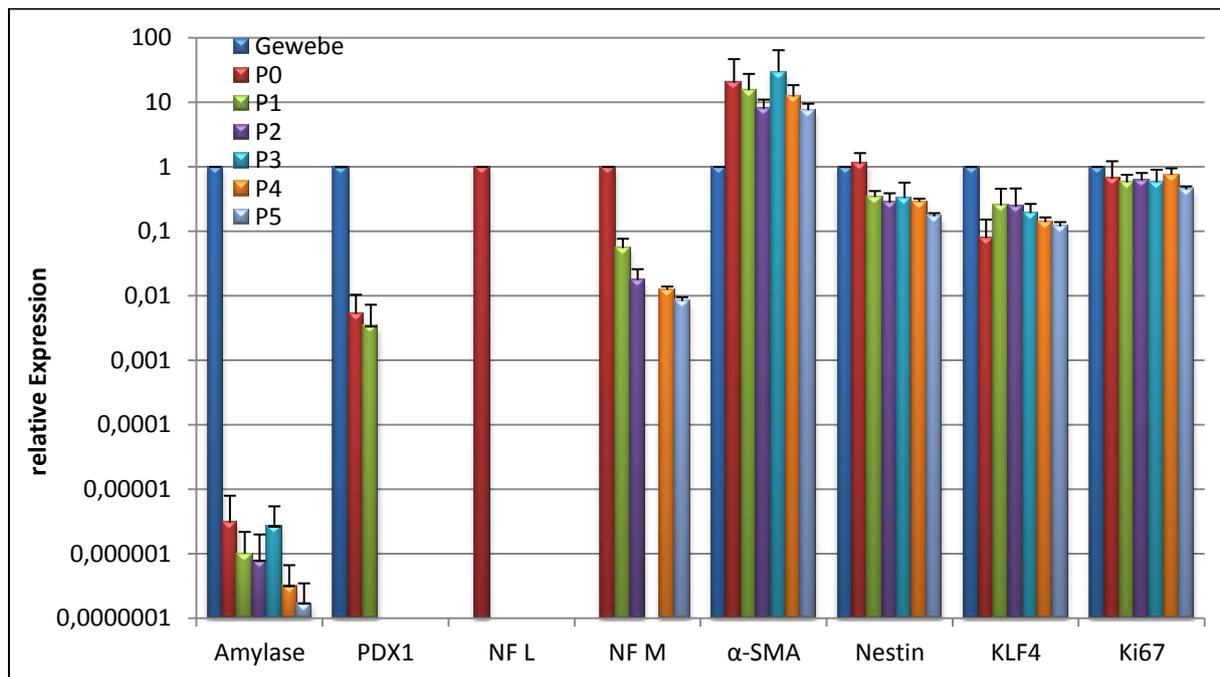


Abbildung 13: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene im Gewebe und in den Passagen 0 bis 5. Die Expression der pankreasspezifischen Gene AMY1 und PDX1 sank durch die Inkulturnahme signifikant. Eine Expression von Neurofilamenten konnte nur in den kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von ACTA2 wurde durch die Kultivierung stark erhöht. Es konnte keine Veränderung der Expression von Ki67 und ein sinken der Expression von Nestin und KLF4 gezeigt werden. n = 3. SEM.

Des Weiteren wurde die Proteinexpression der Zellen direkt nach der Präparation (T0), am Ende der Passage 0 und in der fünften Passage mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen ermittelt (Abbildung 14, Anhang: Abbildung 30, Tabelle 7). Hierbei wurden sowohl pankreasspezifische Marker, wie die Verdauungsenzyme Amylase (Schibler, Tosi et al. 1980) und Elastase (Sziegoleit, Linder et al. 1985), als auch Marker für die Differenzierung der Zellen in Zellen anderer Keimblätter betrachtet. Für eine mesodermale Differenzierung wurde die Expression von α -SMA, für eine ektodermale Differenzierung die Expression von Neurofilamenten (NF) ermittelt. Epitheliale Zellen konnten mit CK18 nachgewiesen werden (Moll, Franke et al. 1982). Nestin wurde als Marker für Stammzellen genutzt und die Proliferation wurde mit Ki67 nachgewiesen. Wie schon in der PCR und auch in der globalen Genexpressionsanalyse, konnte gezeigt werden, dass die Zellen durch die Kultivierung ihre pankreatische Identität verloren. Während nach der Isolation noch in 56 % der Zellen Amylase und in 57 % der Zellen Elastase nachgewiesen werden konnte, so stellten die Zellen am Ende der Passage 0 ihre Elastase-Expression komplett ein und nur noch 5 % der Zellen waren Amylase-positiv. In der Passage 5 konnte keines der beiden Verdauungsenzyme mehr nachgewiesen werden. Die *in vitro*-Kultivierung der Zellen führte zu einem drastischen Anstieg der Expression des mesodermalen Markers α -SMA auf 40 % der gesamten Zellpopulation in der Passage 5. Die Expression der leichten Kette des ektodermalen Markers NF konnte für 15 % der Zellen nach der Isolation, aber nur noch für 2 bzw. 1 % der Zellen in höheren Passagen gezeigt werden. Höhere Ketten der Neurofilamente konnten in keiner der Proben nachgewiesen werden. Der epitheliale Marker CK18 wurde von 24 % der frisch isolierten Zellen exprimiert und stieg in der Passage 0 auf 36 % an. Am Ende der Passage 5 konnte er nur noch in 9 % der untersuchten Zellen gefunden werden. Die Proliferation ist innerhalb eines Organes notwendig für die Gewebshomöostase und betrifft nur einzelne Zellen. Hier konnte gezeigt werden, dass die Proliferation durch die Inkulturnahme von 0,4 % auf 18 % anstieg, die Zellen also erst nach der Inkulturnahme die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erlangten. Außerdem konnte in 17 % der Zellen in der Passage 0 der Stammzellmarker Nestin beobachtet werden. Direkt nach der Präparation der Zellen wurde Nestin gar nicht, am Ende des Kultivierungszeitraumes nur noch von 5 % der Zellen exprimiert.

4. Ergebnisse

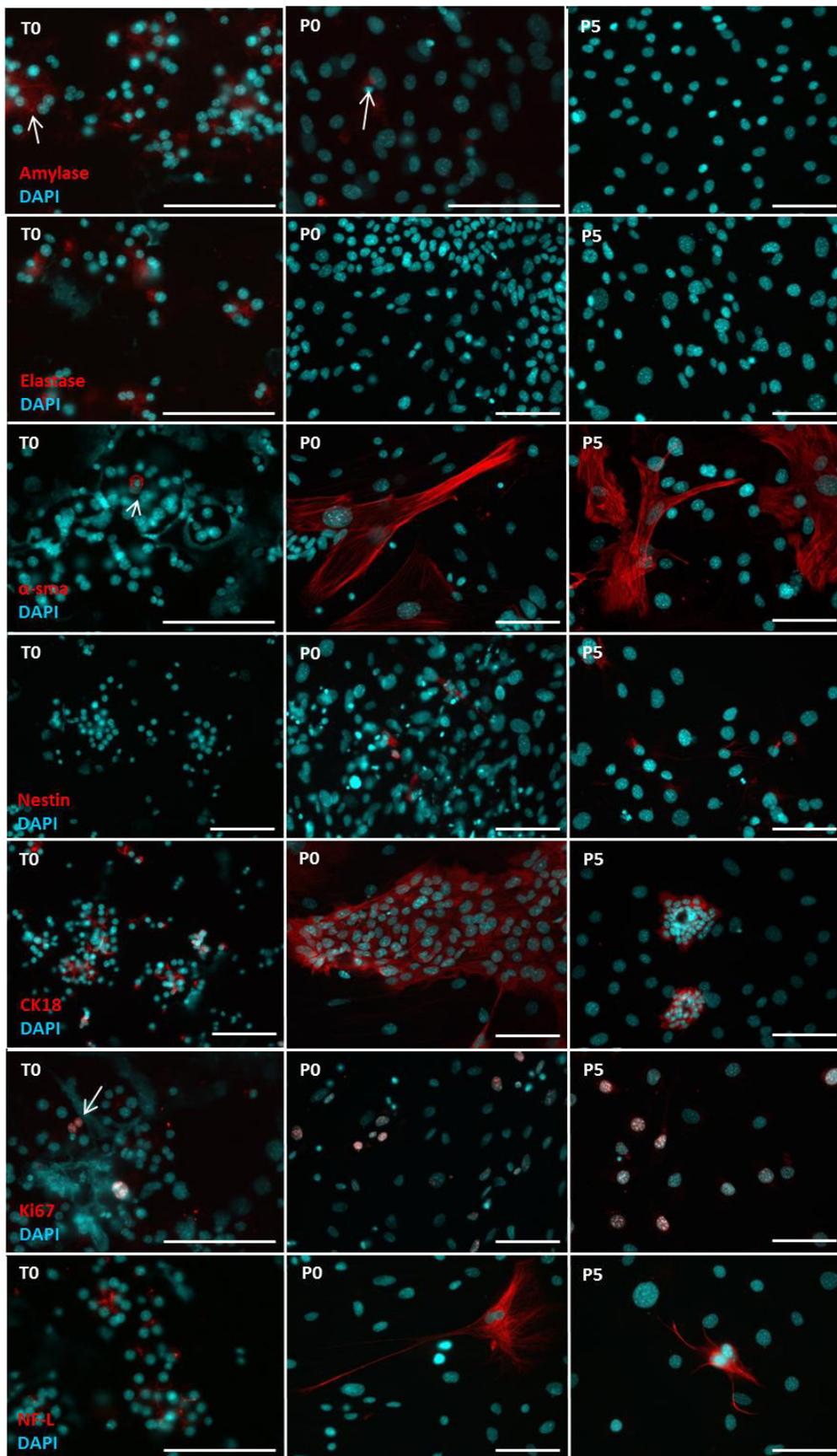


Abbildung 14: Abbildungsunterschrift: s S.57

4. Ergebnisse

Abbildung 14: Immunfluoreszenzfärbung von Zellen direkt nach der Isolation (T0), in den Passagen 0 und 5. Die Expression der pankreasspezifischen Proteine Amylase und Elastase konnte in 56,05 bzw. 57,32 % der frisch isolierten Zellen, nicht jedoch in höheren Passagen nachgewiesen werden. In Passage 0 waren noch 5,08 % der Zellen Amylase-positiv (Pfeil). Das mesodermale α -SMA wurde in 1,67 % der frisch isolierten Zellen exprimiert. Der Anteil an positiven Zellen stieg durch die Inkulturnahme auf 4,85 % in P0 und 40,25 % in P5. Die leichte Kette der Neurofilamente konnte in 15,35 % der Zellen direkt nach der Isolation, jedoch nur noch in 2,71 bzw. 1,07 % der kultivierten Zellen gezeigt werden. Nestin konnte nur in den kultivierten Zellen nachgewiesen werden. In P0 waren 17,35 % der Zellen positiv, in P5 sank der Anteil auf 6,60 %. Die untersuchten Zellen zeigten einen Anstieg der Expression von Ki67, welches in 0,35 % der isolierten Zellen (Pfeil) und in 17,39 bzw. 18,11 % der Zellen in Kultur exprimiert wurde. Der epitheliale Marker CK18 wurde in 23,83 % der frisch isolierten Zellen exprimiert, stieg dann auf 35,63 % in P0 an und fiel in P5 auf 9,49 %. Maßstab: 100 μ m.

Zusätzlich wurden weitere Marker direkt nach der Präparation und in P5 gefärbt (Abbildung 15, Anhang: Abbildung 31, Tabelle 8). Hier konnte der Verlust der pankreatischen Identität durch den Verlust von PDX1 auch auf Proteinebene gezeigt werden. PDX1 wurde in 61 % der isolierten Zellen exprimiert, war aber in den kultivierten Zellen der Passage 5 nicht mehr nachweisbar. Dafür begannen jedoch 42 % der Zellen durch die Kultivierung den Stammzellmarker Nucleostemin zu synthetisieren. Andere Stammzellmarker, wie Oct-4, Nanog, Sox2 und der Pluripotenzmarker KLF4, konnten nicht nachgewiesen werden.

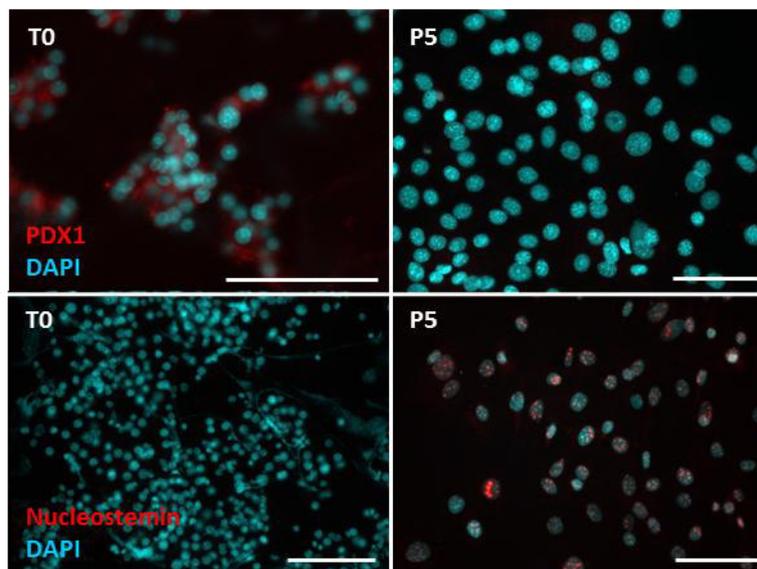


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von Zellen direkt nach der Isolation (T0) und in der Passage 5. Der pankreasspezifische Marker PDX1 wurde von 61,07 % der frisch isolierten Zelle exprimiert, konnte in Passage 5 jedoch nicht mehr nachgewiesen werden. Nucleostemin wurde dagegen erst nach der Inkulturnahme von 41,57 % der Zellen exprimiert. Maßstab: 100 μ m.

Insgesamt konnte durch die Immunfluoreszenzfärbung gezeigt werden, dass die untersuchten Zellen durch die Kultivierung ihren exokrinen pankreatischen Charakter

verloren, dafür aber temporär begannen Marker mindestens eines anderen Keimblattes zu exprimieren. Zudem konnte eine Stammzellartigkeit durch die temporäre Expression von Nestin und Nucleostemin und das Einsetzen der Proliferation in der Zellkultur nachgewiesen werden.

4.2.2 Untersuchung der Herkunft der Zellpopulation

Als nächstes wurde untersucht, ob die betrachtete Zellpopulation aus ursprünglich terminal differenzierten exokrinen Zellen, die durch *Instruktion* eine größere Plastizität erhalten, oder durch *Selektion* von Stammzellen, die die differenzierten Zellen überwachsen, entsteht.

Um herauszufinden, welcher Zelltyp den Ursprung der betrachteten Zellpopulation darstellt, wurden exokrine Pankreazellen mit Hilfe eines Reportersystems stabil markiert. Hierfür wurde ein Cre-loxP-Reportersystem genutzt, bei dem die Cre-Rekombinase durch einen Elastase1-Promotor, der spezifisch für exokrine Pankreazellen ist, reguliert wird. In Zellen, in denen das Verdauungsenzym Elastase exprimiert wird, wird auch die Rekombinase synthetisiert, welche wiederum eine von loxP-Sites flankierte Stopp-Sequenz schneiden kann. Diese Stopp-Sequenz ist einem LacZ-Gen vorgeschaltet und inhibiert so dessen Expression. Wird die Stopp-Sequenz aus dem Reporterkonstrukt herausgeschnitten, kann die Expression der vom LacZ-Gen codierten β -Galactosidase nachgewiesen werden. Um die Aktivierung des Reportersystems zeitlich induzierbar zu machen, ist die Rekombinase mit einer modifizierten Ligandenbindungsdomäne von Estrogen-Rezeptoren fusioniert, die nicht mehr körpereigenes Estrogen, sondern synthetisches Tamoxifen binden kann. Erst nach der Gabe von Tamoxifen wird die Rekombinase aktiviert und kann in den Zellkern gelangen, um dort das Reporterkonstrukt zu schneiden.

Die intraperitoneale Gabe von 4-Hydroxytamoxifen erfolgte an fünf aufeinanderfolgenden Tagen. Fünf Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Zellen aus dem Pankreas nach Protokoll (s. 3.2.3) isoliert. Der Nachweis der β -Galactosidase erfolgte mittels X-Gal-Test im Gewebe, direkt nach der Isolation (T0) und am Ende der Passagen 0 bis 5.

Um den Erfolg der Aktivierung des Reportersystems zu überprüfen, wurden zunächst Dünnschnitte des Pankreas angefertigt und mit Hilfe des X-Gal-Tests angefärbt. Die

Expression der β -Galactosidase, und somit die Effizienz der Aktivierung, konnte auf diese Art im Pankreasgewebe nachgewiesen werden (Abbildung 16, A).

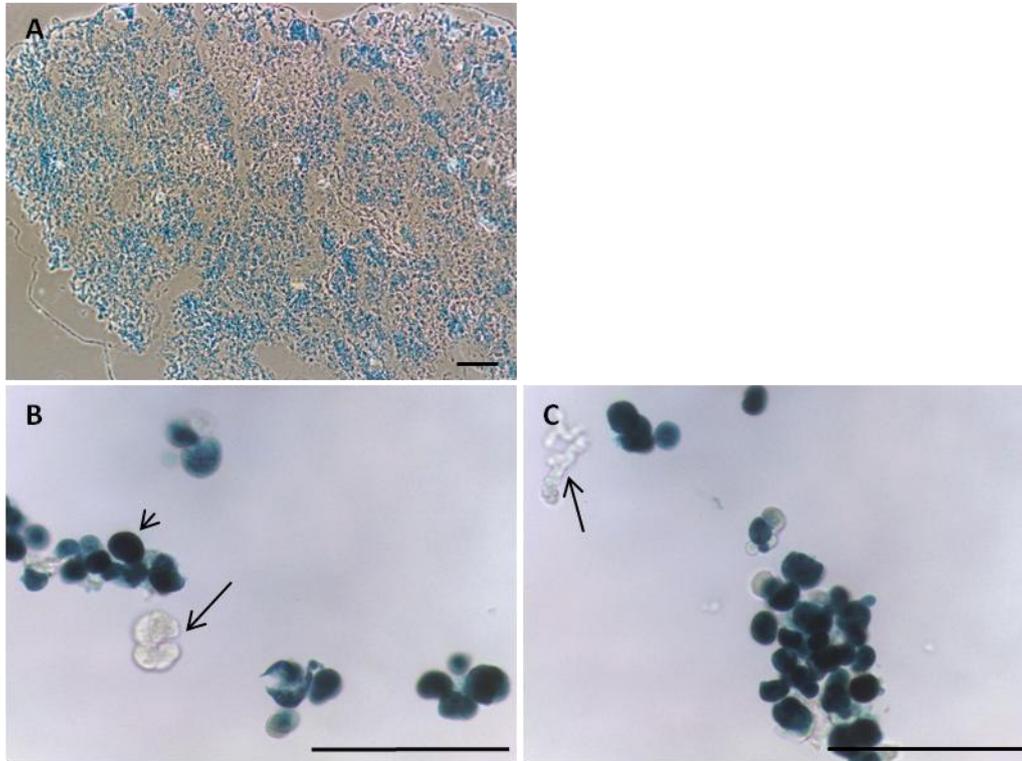


Abbildung 16: X-Gal-Färbung an murinen Pankreaszellen. A: Gewebe-Dünnschnitt, B und C: Frisch isolierte Zellen. Zellen, die die β -Galactosidase exprimieren, sind blau gefärbt (B: kurzer Pfeil), Zellen, in denen das Reporterkonstrukt nicht geschnitten wurde, sind ungefärbt (B: langer Pfeil). Gangzellen (C: Pfeil) wurden nicht gefärbt. Maßstab: 100 μ m.

Nach der Isolation der exokrinen Acini konnte die Expression der β -Galactosidase in 41,5 % der Acini gezeigt werden (Abbildung 16, B: kurzer Pfeil). In 58,5 % der Zellen konnte das Reporterkonstrukt durch die Tamoxifengabe jedoch nicht induziert werden (B: langer Pfeil). In Gangzellen, die auch exokrinen Ursprungs sind, jedoch keine Elastase exprimieren, wurde das Reportersystem nicht aktiviert (C: Pfeil).

Im weiteren Verlauf der Kultivierung konnte die β -Galactosidase über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen nachgewiesen werden, wobei der Anteil an positiven Zellen mit der Dauer der Kultivierung abnahm (Abbildung 17, Abbildung 18, Anhang: Tabelle 9). Direkt nach der Isolation der Zellen lag der Anteil an positiven Zellen bei 41,5 %. Leider konnte die Expression der β -Galactosidase zu diesem Zeitpunkt nicht in allen untersuchten Proben gezeigt werden. In einer der Proben war die Expression erst am Ende der Passage 0, in einer anderen erst ab Passage 1 nachweisbar. Diese Proben benötigten

4. Ergebnisse

eine längere Zeit, um nach der Aktivierung des Reportersystems die β -Galactosidase zu exprimieren. Am Ende der Passage 0 war der Anteil an β -Galactosidase-positiven Zellen bereits auf 16,9 % gesunken. In Passage 1 fiel der Anteil an positiven Zellen auf 13,2 %. In fast allen untersuchten Proben gab es einen kurzzeitigen Anstieg der Expression in Passage 2 auf durchschnittlich 28,4 %. In den Passagen 3 und 4 sank die Expression jedoch wieder auf 17 und 10,2 % und erreichte ein Minimum nach fünf Passagen in Kultur mit nur noch 1,76 %.

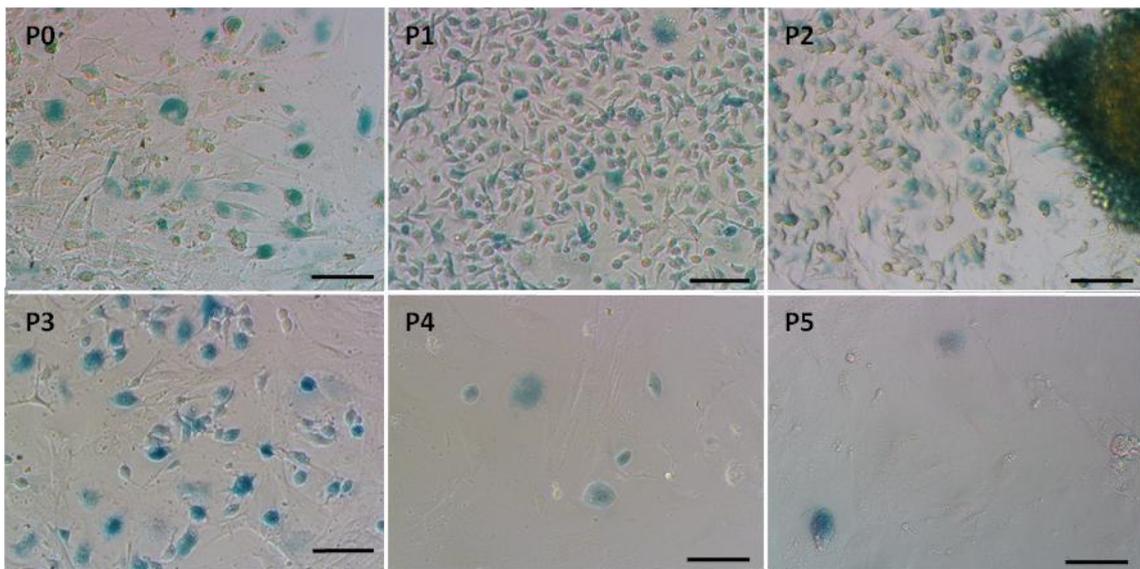


Abbildung 17: β -Galactosidase-Expression exokriner Pankreaszellen. Der Nachweis erfolgte über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen mittels X-Gal-Test. Zellen, in denen die β -Galactosidase exprimiert wird, sind blau gefärbt. Der Anteil an β -Galactosidase-positiven Zellen nimmt mit der Dauer der Kultivierung ab. Maßstab: 100 μ m.

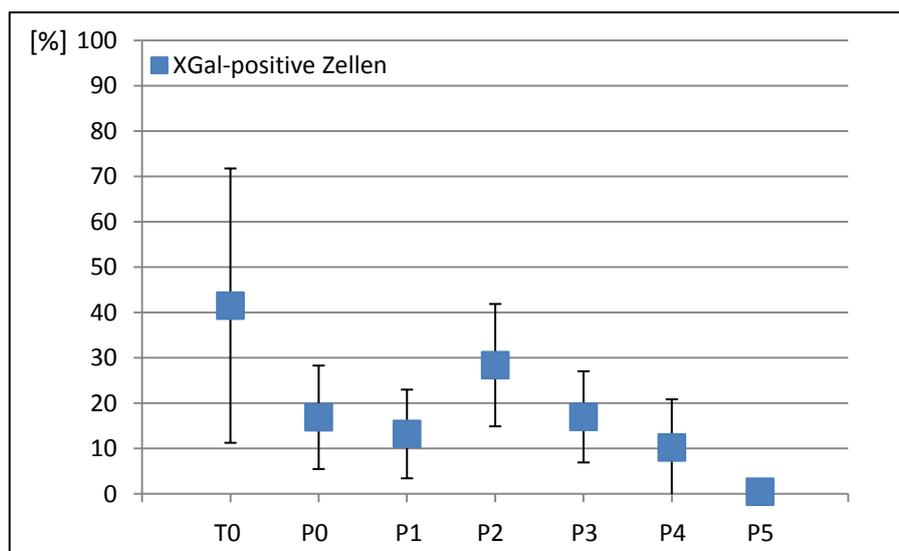


Abbildung 18: Anteil an β -Galactosidase synthetisierenden Zellen an der Gesamtpopulation. T0, P0: n=3; P1-P5: n=5.SEM.

Für die Abnahme an markierten Zellen können mehrere Gründe in Frage kommen. Es ist beispielsweise möglich, dass tatsächlich nur wenige exokrine Acini nach der Präparation adhären und einzelne Stammzellen einen Großteil der Ursprungspopulation ausmachen. Diese überwachsen nach und nach die exokrinen Zellen und verdrängen die differenzierten Zellen nach fünf Passagen fast vollständig. Gegen diese Theorie sprechen allerdings die Ergebnisse der *Time-lapse*-Analyse und des *Microarrays*. Die *Time-lapse*-Analyse zeigt deutlich, dass exokrine Acini adhären und den überwiegenden Teil der Ausgangspopulation stellen. Die Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalyse zeigen, dass die Expression der gesamten Zellpopulation innerhalb kürzester Zeit umgestellt wird. Das langsame Verdrängen eines Zelltypen durch einen anderen hätte dagegen eine entsprechend langsamere Änderung der Genexpression zur Folge.

Zudem könnten auch exokrine Zellen, die nicht markiert wurden (hier: 58,5 %), den Ursprung der Zellpopulation bilden. Es ist durchaus möglich, dass die Expression der β -Galactosidase die Zellen in ihrer Fähigkeit zu adhären, oder zu proliferieren einschränkt, wodurch die markierten Zellen von nicht markierten Zellen überwachsen würden.

4.3 Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen

Zuletzt wurden die Bedingungen der Inkulturnahme und Kultivierung von exokrinen Speicheldrüsenzellen männlicher Wistar-Ratten systematisch variiert, um den Einfluss der unterschiedlichen Faktoren auf die entstehende Zellpopulation zu untersuchen.

Es gibt drei grundlegende Faktoren, die die Inkulturnahme und Kultivierung von adhären wachsenden Zellen beeinflussen: der enzymatische Verdau von Zellen und Geweben mit Kollagenase und Trypsin, die Kultivierung mit serumhaltigem Medium und die Adhäsion der Zellen an Zellkulturoberflächen (Abbildung 1, Abbildung 2).

Im Laufe der Kultivierung kommen Zellen immer wieder mit Verdauungsenzymen in Kontakt: Während der Präparation werden die Zellen mit Hilfe von Kollagenase aus dem Gewebsverband gelöst und für die Propagation werden die Zellen mit Trypsin behandelt, um sie von der Zellkulturoberfläche abzulösen und die Zell-Zell-Kontakte zu unterbrechen.

4. Ergebnisse

Zunächst wurde der Effekt des Kollagenaseverdau während der Isolation auf die entstehende Population untersucht. Hierfür wurden Zellen aus der Speicheldrüse mit und ohne enzymatischen Verdau isoliert und die Zellpopulation über fünf Passagen betrachtet. Während der Isolation ließen sich keine Unterschiede zwischen den enzymatisch behandelten und den unbehandelten Zellen erkennen. Auch ohne einen enzymatischen Verdau konnten Acini aus dem Gewebe gewonnen werden, die keine morphologischen Unterschiede zu den herkömmlich isolierten Zellen zeigten (Abbildung 19).

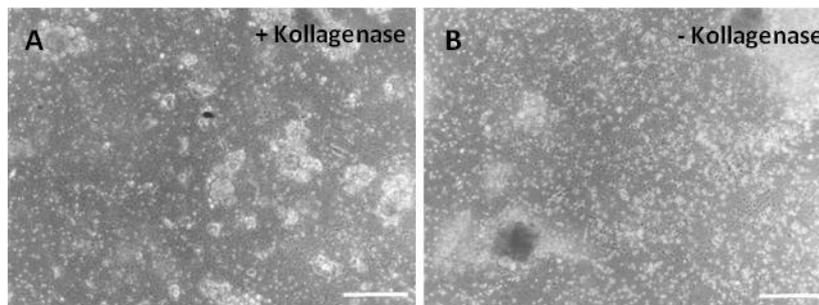


Abbildung 19: Mit und ohne Kollagenase isolierte Zellen direkt nach der Präparation. a) mit Kollagenase isolierte Acini, b) ohne Kollagenase isolierte Acini. Die Bilder sind in Graustufen dargestellt. Maßstab: 200 µm.

Allerdings konnten mit Hilfe der Kollagenase signifikant mehr Zellen aus dem Gewebe isoliert werden (Abbildung 20). Die unbehandelten Zellen adhärten langsamer, zeigten dann aber eine vergleichbare spindelförmige Morphologie und ein nicht signifikant schlechteres Wachstum (Anhang: Abbildung 32 und 33). Zudem konnten keine Unterschiede in der Stoffwechselaktivität festgestellt werden (Anhang: Abbildung 34).

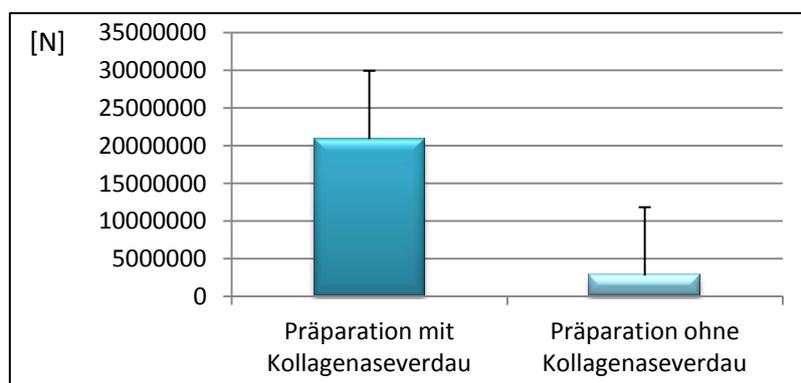


Abbildung 20: Effekt des enzymatischen Verdau während der Isolation auf die Zellausbeute. Mit einem Kollagenaseverdau konnte etwa das Siebenfache der Zellen isoliert werden. N=Anzahl der isolierten Zellen, n = 3, SEM.

4. Ergebnisse

Somit kann festgehalten werden, dass der enzymatische Verdau von Geweben zwar für eine größere Zellausbeute sorgt, aber keinen Effekt auf die entstehende Zellpopulation hat.

Um den Effekt des Trypsinverdau während der Propagation zu ermitteln, wurden die Speicheldrüsenzellen mit Trypsin oder ohne Trypsin, durch Schaben, von der Zellkulturoberfläche gelöst. Der Verdau von Zellen mit Trypsin hat zwei Effekte: Zum einen werden die Zellen von der Zellkulturoberfläche gelöst, zum anderen werden die Verbindungen zwischen den Zellen abgebaut, wodurch eine Einzelzellsuspension entsteht. Wurden Zellen ohne ein Verdauungsenzym passagiert, konnten diese Verbindungen nicht gelöst werden und die Zellen blieben als größere Zellaggregate aneinander hängen. Diese Aggregate brauchten in der Regel bis zu einer Woche, bis sie adhärten und Zellen aus ihnen auswachsen (Abbildung 21). Gleichzeitig wuchs hier ein wesentlich geringerer Teil an Zellen an. Viele Einzelzellen starben und wurden beim Medienwechsel entfernt.

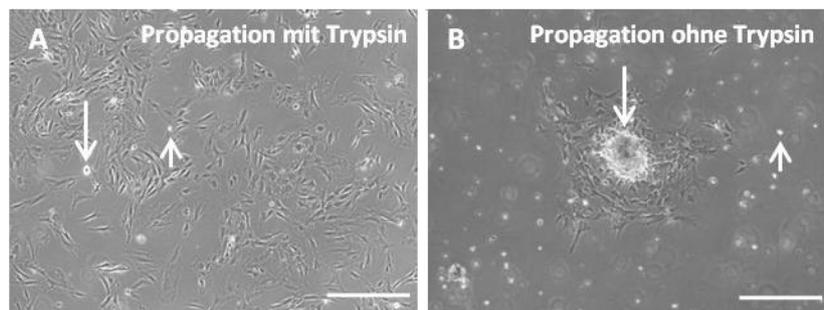


Abbildung 21: Zellen vier Tage nach der Propagation mit und ohne Trypsin. a) Vier Tage nach der Propagation mit Trypsin sind die Zellen adhären, gleichmäßig über die Oberfläche verteilt und teilen sich (langer Pfeil). Es sind zudem nur wenige tote Zellen sichtbar (kurzer Pfeil). b) Vier Tage nach der Propagation ohne Trypsin sind Zellaggregate (langer Pfeil) adhären und Zellen wachsen aus ihnen aus. Gleichzeitig sind viele nicht adhären, tote Zellen sichtbar (kurzer Pfeil). Die Bilder sind in Graustufen dargestellt. Maßstab: 500 µm.

Auch wenn die Zellen ohne Enzymverdau wesentlich länger brauchten, um zu adhären, zeigen sie über den betrachteten Zeitraum kein verändertes Wachstum (Anhang: Abbildung 35). Während die ersten zwei Propagationen ohne Trypsinverdau keinen Einfluss auf die Zellen zu haben schienen, zeigten sie spätestens nach dem dritten Passagieren einen signifikant verlangsamten Stoffwechsel (Abbildung 22).

4. Ergebnisse

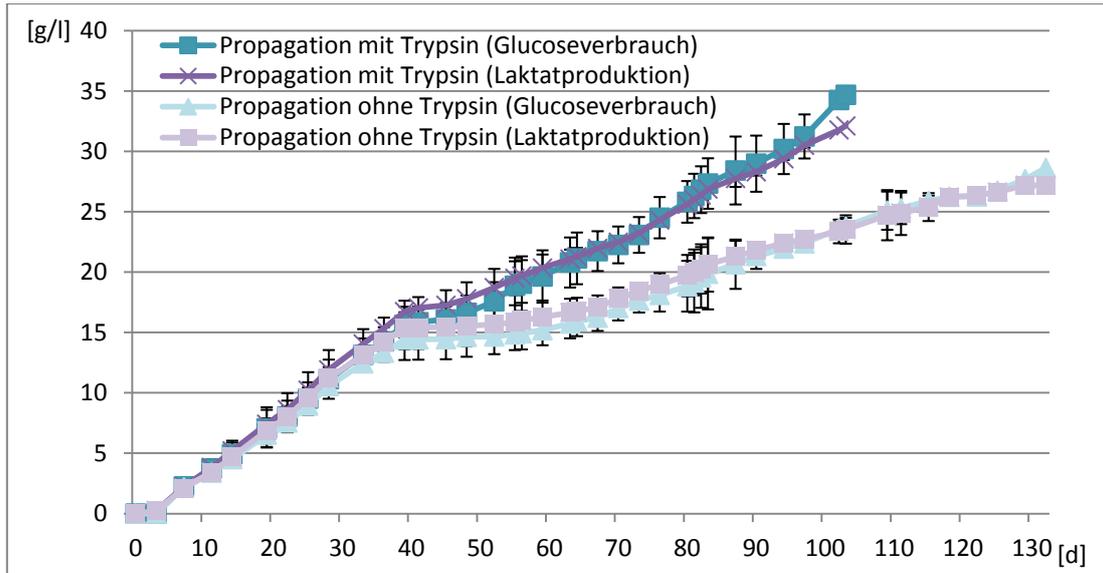


Abbildung 22: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit bzw. ohne Trypsin propagiert wurden.

Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde vor jedem Medienwechsel eine Probe entnommen und der Glukose- und Laktatgehalt bestimmt. Die Stoffwechselaktivität wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen gemessen. $n = 3$, SEM.

Der Verdau mit Trypsin während der Propagation hat somit zur Folge, dass Zellen aggregieren und dadurch schlechter adhären. Dies führt zu einem verzögerten Wachstum und einer verlangsamten Stoffwechselaktivität.

Als nächstes wurde untersucht, welchen Effekt die Kultivierung mit serumhaltigem Medium auf die entstehende Zellpopulation hat. Hierfür wurden die Zellen direkt nach der Isolation und während des gesamten Kultivierungszeitraums mit unterschiedlichen Serumanteilen kultiviert. Die herkömmliche Kultivierung erfolgte mit 10 % Serum im Kulturmedium. Um den Effekt des Serumanteils zu prüfen, wurden Zellen zusätzlich mit 5 % oder mit 1 % Serum kultiviert.

Den gravierendsten Effekt zeigte eine Kultivierung der Zellen mit nur 1 % fetalem Kälberserum (FKS). Die Zellen wurden langsamer adhären und es wuchsen wesentlich weniger Zellen an. Nach einer Woche in Kultur konnte beobachtet werden, dass Zellen, die in 10 % FKS-DMEM kultiviert wurden, eine spindelförmige Morphologie zeigten und nahezu konfluent waren. Zellen, die mit 5 % Serum behandelt wurden, waren nur wenig langsamer in ihrem Wachstum und wiesen die gleiche spindelförmige Morphologie auf.

4. Ergebnisse

Die Zellen, die mit 1 % Serum kultiviert wurden, waren zum Teil spindelförmig, häufig kugelig abgerundet und bedeckten nur geringe Teile der Zellkulturoberfläche (Abbildung 23).

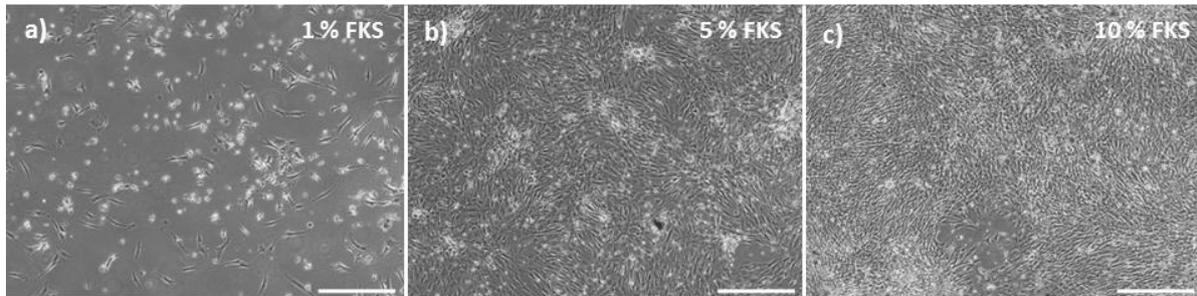


Abbildung 23: Morphologie von Zellen mit unterschiedlichen Serumanteilen nach einer Woche in Kultur. a) Bei 1 % Serum sind viele Zellen kugelig abgerundet und bedecken nur einen geringen Anteil der Oberfläche. b) Eine Kultivierung mit 5 % Serum führt zu einem nahezu unveränderten Wachstum. Die Zellen sind spindelförmig. c) Bei einer Kultivierung mit 10 % Serum sind die Zellen nach einer Woche in Kultur nahezu konfluent und weisen eine Spindelform auf. Die Bilder sind in Graustufen dargestellt. Maßstab: 500 µm.

Um den Effekt des Serumanteils auf die Proliferation in Passage 0 zu überprüfen, wurde der Anteil an DNA-synthetisierenden Zellen mit Hilfe des *Click-iT*[®]-Assays in den ersten 8 Tagen in Kultur bestimmt (Abbildung 24).

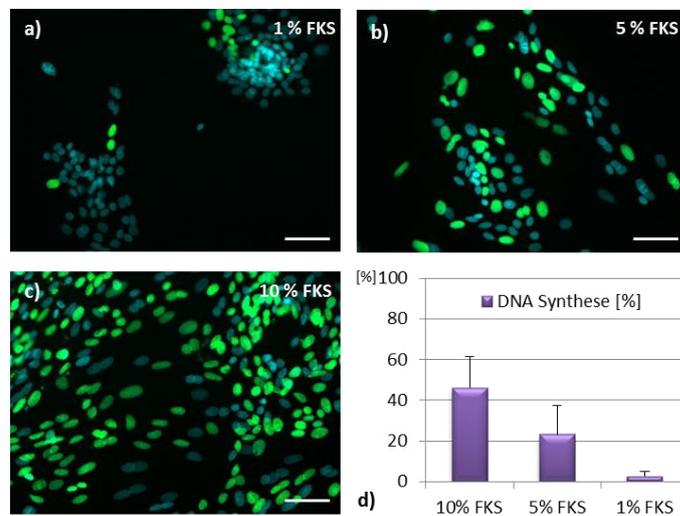


Abbildung 24: Untersuchung der DNA-Neusynthese von Zellen, die mit unterschiedlichem Serumgehalt kultiviert wurden. Die DNA-Synthese wurde mit Hilfe des *Click-iT*[®] Proliferationsassays nachgewiesen. a) Zellen, die in 1 % DMEM kultiviert wurden, zeigten eine Neusynthese von 2,8 %. b) 5 % FKS-DMEM führt zu einer Proliferationsrate von 23 %. c) 46 % der Zellen, die einem Serumanteil von 10 % ausgesetzt waren, synthetisierten neue DNA. Maßstab: 100 µm d) Graphische Darstellung der Syntheseraten. n = 3, SEM.

4. Ergebnisse

Nach 8 Tagen in Kultur hatten 46 % der Zellen, die in 10 % FKS-DMEM kultiviert wurden, DNA neu synthetisiert und dabei 5-Ethynyl-2'-deoxyuridin (EdU) in die DNA-Doppelhelix eingebaut. Die Kultivierung der Zellen mit 5 % FKS senkte die DNA-Synthese auf 23 %. Durch die Kultivierung mit 1 % Serum wurde die Syntheserate auf 2,8 % gesenkt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der Serumgehalt im Medium einen direkten Einfluss auf die Neusynthese von DNA und somit auf die Proliferation der Zellen hat.

Zellen, die in 1 % FKS-DMEM kultiviert wurden, zeigten einen signifikant veränderten Stoffwechsel. Zunächst war der Glukoseverbrauch bzw. die Laktatproduktion wesentlich schwächer, als die der Zellen, die mit höherem Serumgehalt kultiviert wurden, nach ca. 20 Tagen schienen die Zellen jegliche Stoffwechselaktivität einzustellen (Abbildung 25).

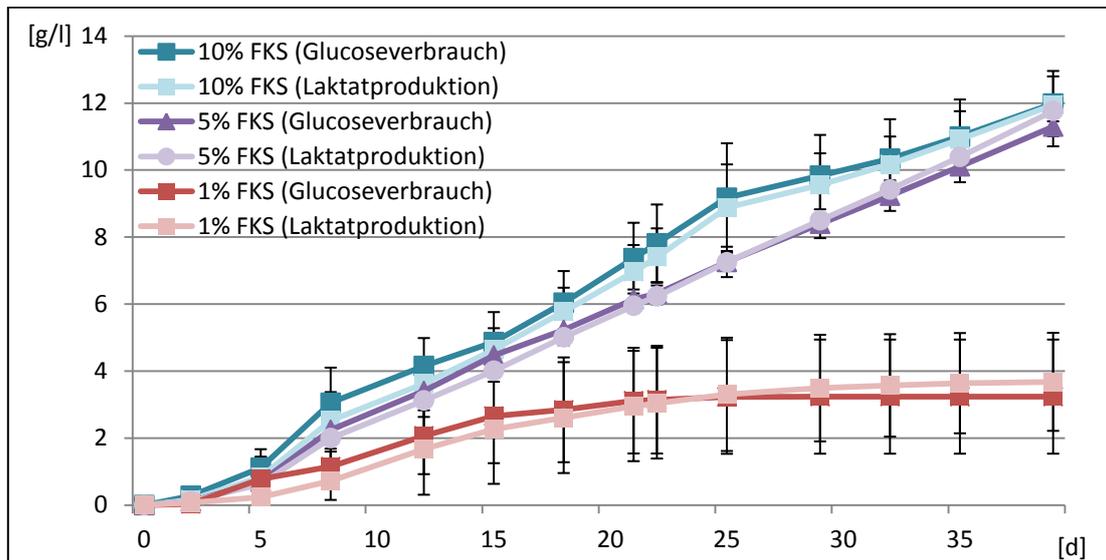


Abbildung 25: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit 1 %, 5 % oder 10 % Serum kultiviert wurden. Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde vor jedem Medienwechsel eine Probe entnommen und der Glukose- und Laktatgehalt bestimmt. Die Stoffwechselaktivität wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen gemessen. n = 3, SEM.

Während das Wachstum von Zellen mit 5 % Serum im Kultivierungsmedium kaum beeinflusst schien, zeigten die Zellen, die mit 1 % Serum kultiviert wurden, zunächst kein signifikantes Wachstum und starben nach kurzer Zeit in Kultur ab (Abbildung 26).

4. Ergebnisse

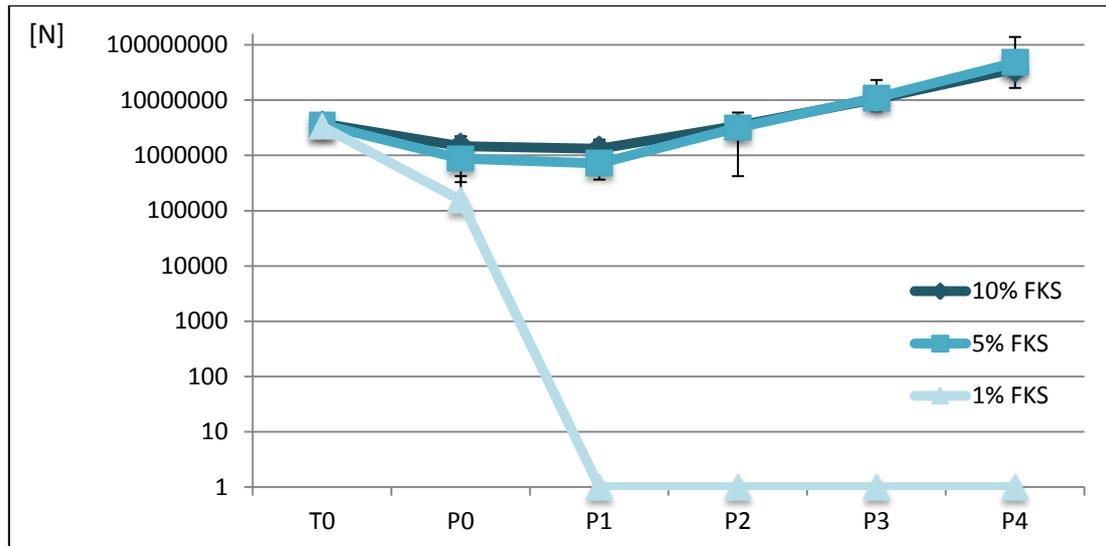


Abbildung 26: Wachstum von Speicheldrüsenzellen mit unterschiedlichem Serumanteil im Kulturmedium. Die Zellzahl wurde direkt nach der Isolation (T0), sowie am Ende jeder Passage (P) bestimmt. N=Zellzahl; n=3; SEM.

Der Versuch, Zellen mit 1 % FKS zu kultivieren, musste nach 39 Tagen abgebrochen werden, da zu diesem Zeitpunkt keine vitalen Zellen mehr in der Kultur sichtbar waren. Im weiteren Verlauf wurden nur noch Zellen, die mit 5 % Serum bzw. 10 % Serum kultiviert wurden, miteinander verglichen. Hier waren jedoch keine signifikanten Unterschiede im Wachstum oder in der Stoffwechselaktivität erkennbar (Abbildung 26, Anhang: Abbildung 36).

Insgesamt kann ein direkter Zusammenhang zwischen dem Serumgehalt und der Proliferation von Zellen beobachtet werden. Gleichzeitig ist der Effekt des Serums auf den Stoffwechsel und das Wachstum der Zellen erst bei einem Gehalt von weniger als 5 % signifikant. Serum ist für die Kultivierung von Zellen essentiell, da es durch den hohen Gehalt an Proteinen und Wachstumsfaktoren deren Überleben sichert.

Zuletzt wurde der Effekt der Adhärenz während der *in vitro*-Kultur untersucht. Hierfür wurden exokrine Speicheldrüsenzellen direkt nach der Isolation in normaler Zellkulturplastik oder in Agarose-beschichteten bakteriologische Zellkulturschalen kultiviert, um deren Anheftung zu verhindern (Steward, Liu et al. 2011). Zusätzlich wurden die Zellen in FKS-DMEM mit geringem CaCl_2 -Gehalt kultiviert, um für die Adhärenz essentielle extrazelluläre zweiwertige Ionen zu entziehen (Takeichi 1977).

4. Ergebnisse

Die Möglichkeit an Oberflächen anzuhafte ist für adhären wachsende Zellen essentiell und so hat der Entzug dieser Möglichkeit auch den gravierendsten Effekt auf die Zellpopulation.

Speicheldrüsenzellen aus der Ratte, die in Suspension kultiviert wurden, hafteten aneinander fest und begannen innerhalb von 24 Stunden Aggregate zu bilden (Abbildung 27, e). Im Gegensatz zu den adhären wachsenden Zellen (Abbildung 27, d) konnten hier während der Kultivierung keine Zellteilungen beobachtet werden.

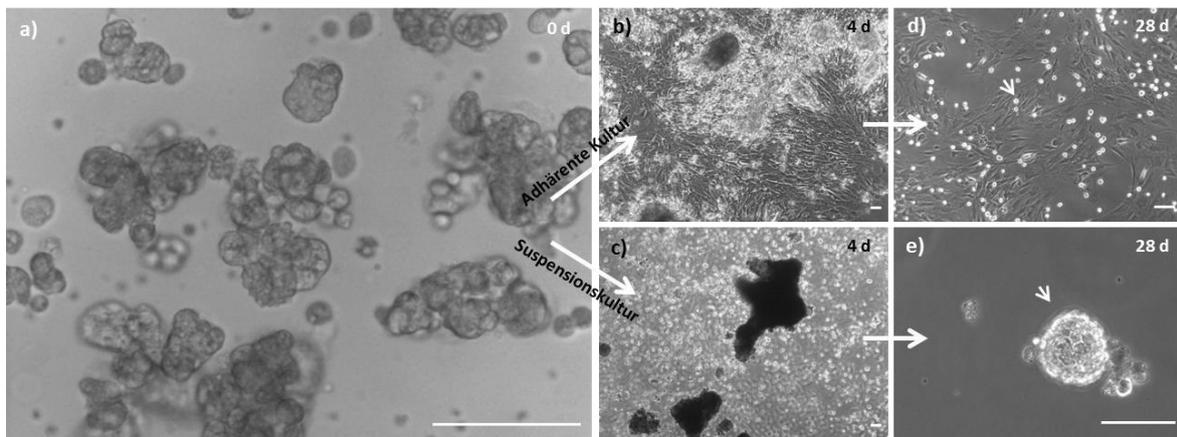


Abbildung 27: Adhären und nicht adhären Kultivierung exokriner Speicheldrüsenzellen. a) Zellen direkt nach der Präparation. Herkömmlich kultivierte Zellen b) nach 4 Tagen und d) nach 28 Tagen in Kultur. Nicht adhären kultivierte Zellen c) nach 4 Tagen und e) nach 28 Tagen in Kultur. Alle Bilder sind in Graustufen dargestellt. d=Tag, Maßstab: 100 µm.

Diese Aggregate blieben bis zu 25 Tage stabil, danach begannen sie durchsichtige blasenartige Strukturen aus extrazellulärer Matrix auszubilden, in denen immer weniger Zellen zu erkennen waren, bis das Aggregat vollständig aufgelöst und keine bzw. fast keine Zellen mehr sichtbar waren (Abbildung 28).

Nach einer Kultivierungsdauer von 37 Tagen konnten keine Zellen mehr in der Suspensionskultur nachgewiesen werden, wohingegen die adhären wachsenden Zellen kein verändertes Wachstum zeigten. (Abbildung 29).

4. Ergebnisse

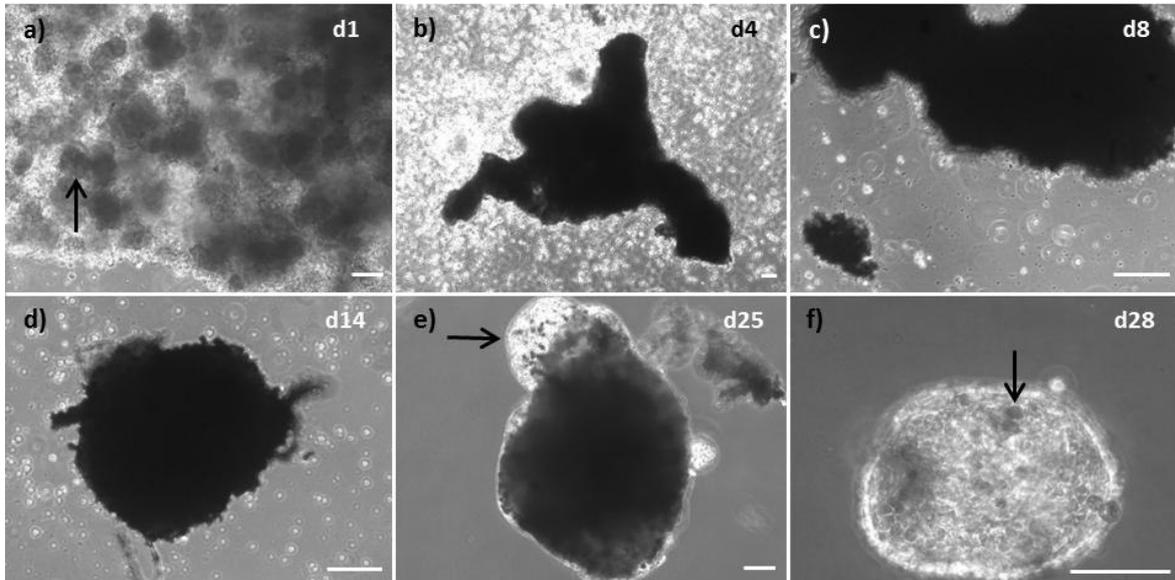


Abbildung 28: Zellaggregate in Suspensionskultur. Durch den Entzug der Adhärenz begannen die Zellen innerhalb eines Tages mit der Bildung erster Aggregate (a, Pfeil), die über einen Zeitraum von ca. drei Wochen stabil in der Kultur blieben (b-d). Nach drei Wochen begannen sich erste Strukturen der Aggregate aufzulösen (e), wobei Bereiche aus extrazellulärer Matrix mit nur noch wenigen Zellen sichtbar wurden (Pfeil). Nach vier Wochen waren die Zellen aus den Aggregaten fast vollständig verschwunden und nur noch wenige Zellen konnten erkannt werden (f, Pfeil). Alle Bilder sind in Graustufen dargestellt. d = Tag Maßstab: 100 μm .

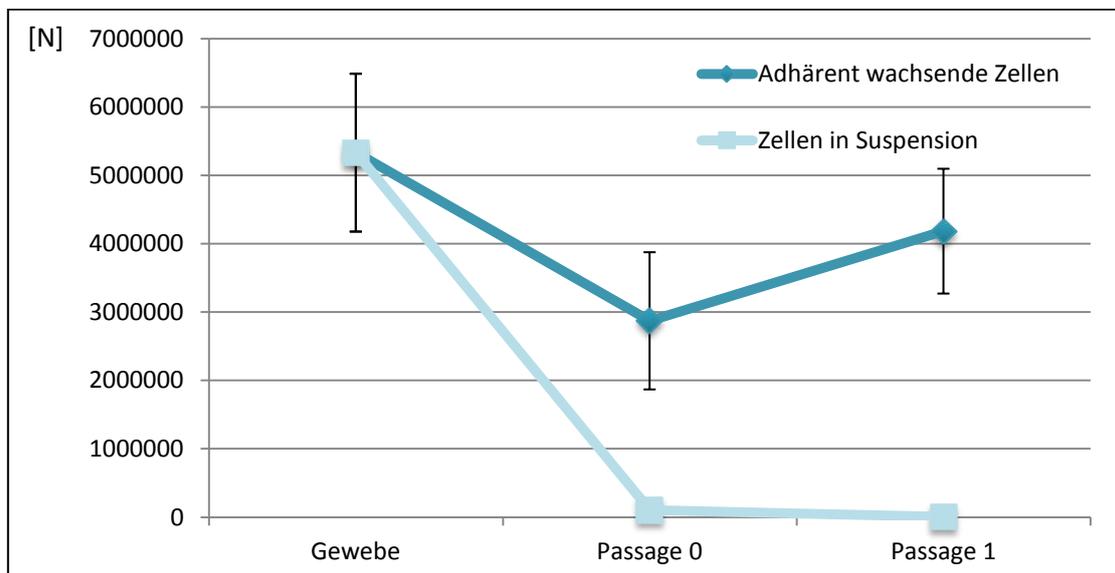


Abbildung 29: Wachstum von adhärenz wachsenden und Suspensionskultur-Zellen. Die Zellzahl wurde direkt nach der Isolation (T0), sowie am Ende jeder Passage (P) bestimmt. Adhärenz wachsende Zellen zeigten kein verändertes Wachstum, Zellen in Suspensionskultur konnten sich nicht vermehren und starben. N = Zellzahl, n = 3, SEM.

4. Ergebnisse

Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 4 Tagen sank die Stoffwechselaktivität der Zellen in Suspensionskultur signifikant ab, bis die Zellen schließlich nach 10 Tagen kaum noch Glukose verbrauchten, bzw. nach sechs Tagen die Laktatproduktion komplett einstellten (Abbildung 30).

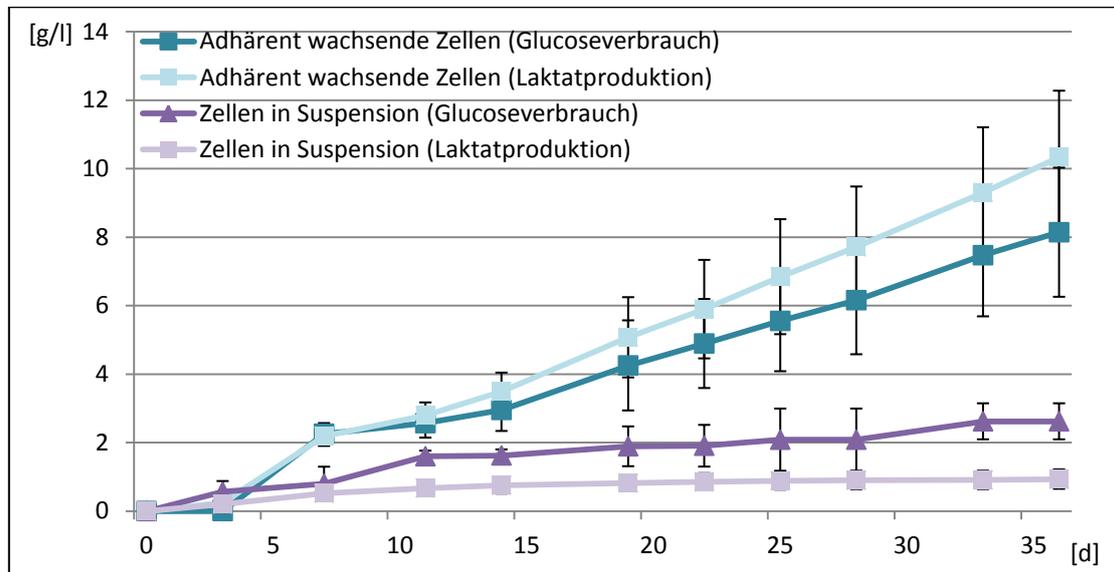


Abbildung 30: Stoffwechselaktivität von adhären wachsenden Zellen und Zellen in Suspensionskultur. Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde vor jedem Medienwechsel eine Probe entnommen und der Glukose- und Laktatgehalt bestimmt. Die Stoffwechselaktivität wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen gemessen. $n = 3$, SEM.

Die Möglichkeit an Oberflächen zu adhären hatte den größten Effekt auf die untersuchte Zellpopulation. Wenn adhären wachsenden Zellen die Möglichkeit zur Adhäsion genommen wird, bilden sie Aggregate und sterben nach wenigen Tagen der Kultivierung.

5. Diskussion

Die *in vitro*-Kultivierung von Zellen ist heute eine der grundlegenden Techniken für die Untersuchung biologischer Funktionen, für den therapeutischen Ersatz von Zellen und Geweben und für die Herstellung von Zellkomponenten. Trotz der vielen Vorteile, die die Untersuchung von Zellen außerhalb des Organismus bietet, gibt es Grenzen für dieses Verfahren, wenn differenzierte Zellen und ihre Funktionen über einen längeren Zeitraum beobachtet werden. Es erweist sich als besonders schwierig, die Differenzierung und somit die organismische Funktion von Zellen über einen längeren Zeitraum *ex vivo* aufrecht zu erhalten; oftmals auch ihr Überleben zu gewährleisten. Der Verlust der Differenzierung durch die *in vitro*-Kultivierung macht eine Untersuchung physiologischer Fragestellungen oder die Zucht funktioneller Gewebe nahezu unmöglich. Sie gelingt nur durch die Redifferenzierung der Zellen mit Hilfe von Wachstumsfaktoren und Chemikalien, die dem Kulturmedium zugesetzt werden, oder durch eine dreidimensionale Kultivierung in *organoid/embryonic bodies* (Keller 1995; Guan, Rohwedel et al. 1999; Pittenger, Mackay et al. 1999).

Prinzipiell stellt sich die Frage, ob Prozesse, die in der Zellkultur beobachtet werden können, überhaupt vergleichbar mit physiologischen Prozessen sind. Zeigen Zellen, die aus dem Gewebsverband herausgelöst werden, nicht stattdessen ein Verhalten, das an die Kultivierungsbedingungen angepasst ist und nur teilweise organismische Funktionen widerspiegelt? Diese Frage ist sehr grundlegend, da sich daraus die Frage ergibt, wie bisher erzielte Ergebnisse gewertet werden müssen und ob die Methode der *in vitro*-Kultivierung grundsätzlich für die Untersuchung physiologischer Funktionen geeignet ist, oder ob gut reproduzierbare Zellkulturartefakte betrachtet werden. Des Weiteren bietet sie die Möglichkeit, die Mechanismen zu studieren, die der organismischen Kooperation, also der Zusammenarbeit und Kommunikation der Zellen untereinander, zugrunde liegen.

Zudem stellt sich die Frage, welche Art von Zellen *in vitro* beobachtet werden kann. Sind es seltene Stammzellspezies, die als einzige in der Lage sind den Prozess der Inkulturnahme zu überleben und somit den Ursprung der *in vitro* vermehrbaren Zellpopulationen stellen? Und falls ja, woher stammen diese? Sind es residente Stammzellen, die im Organ für die

Gewebshomöostase verantwortlich sind, oder mobile Stammzellen, die beispielsweise aus dem Knochenmark stammen und über die Blutbahn in die entsprechenden Gewebe transportiert werden? Oder lassen sich terminal differenzierte Zellen entgegen der landläufigen Meinung *in vitro* kultivieren und propagieren?

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe eines Reportersystems das Schicksal terminal differenzierter exokriner Zellen aus dem Pankreas verfolgt werden, um zu analysieren, ob die daraus resultierende stammzellartige Zellpopulation durch *Selektion* bereits existierender Stammzellen, oder durch *Instruktion* differenzierter Zellen entstanden ist. Zudem wurde in einer globalen Genexpressionsanalyse untersucht, wie sich die Inkulturnahme auf die gesamte Genexpression der Zellpopulation auswirkt, wie schnell die Anpassung der Genexpression an die veränderte Umgebung vonstattengeht und wie stark diese Expressionsänderungen ausfallen. Des Weiteren wurde analysiert, welche Mechanismen der Phänotyp-Veränderung zugrunde liegen und ob diese Mechanismen mit physiologischen Prozessen vergleichbar sind. Schließlich wurde der Einfluss unterschiedlicher Faktoren der Inkulturnahme, wie der enzymatische Verdau von Zellen und Geweben mit Kollagenase und Trypsin, die Kultivierung mit serumhaltigem Medium und die Adhäsion der Zellen an Zellkulturoberflächen, auf die entstehende Zellpopulation untersucht.

5.1 Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen

Während der Inkulturnahme erfahren Zellen viele grundlegende Veränderungen. Sie werden aus dem dreidimensionalen Gewebsverbund herausgerissen und zweidimensional auf einer festen Plastikoberfläche kultiviert. Sie verlieren die direkten Kontakte zu ihren Nachbarzellen und somit auch die lokalen Stimuli aus der Umgebung. Stattdessen werden sie neuen Stimuli ausgesetzt, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren aus dem serumhaltigen Medium. Außerdem kommen die Zellen in Kontakt mit Verdauungsenzymen und werden durch den Präparationsprozess geschädigt, was im Fall von exokrinen Drüsenzellen zu einer Freisetzung weiterer Verdauungsenzyme führt.

Um herauszufinden, welche der Faktoren im Isolations- und Kultivierungsprozess einen Einfluss auf die Entstehung einer Stammzellpopulation haben, wurden drei grundlegende Faktoren näher betrachtet: (1) der enzymatische Verdau von Zellen und Geweben während der Präparation und der Subkultivierung, (2) die Kultivierung mit serumhaltigem Medium und (3) die Adhäsion der Zellen an Zellkulturoberflächen.

Zunächst wurde der Effekt des Kollagenaseverdaus während der Isolation auf die entstehende Zellpopulation untersucht. Das Strukturprotein Kollagen ist das häufigste Protein in mehrzelligen Organismen und kommt in fast jedem Gewebe vor. Es ist die Hauptkomponente des Bindegewebes, der Knochen, des Knorpels, der Zähne und ist ein Hauptbestandteil der Extrazellulären Matrix von Zellen der Haut und der Blutgefäße (Burgeson and Nimni 1992).

Für den Abbau des Kollagens der Extrazellulären Matrix und die damit verbundene Dissoziation des Gewebes, werden Kollagenasen verwendet. Diese gehören zur Familie der Matrix-Metalloproteasen und spalten spezifisch die Tripelhelix von Kollagenmolekülen zwischen Glycin und anderen Aminosäuren. Die hier verwendete Kollagenase stammt aus dem Bakterium *Clostridium histolyticum*, wo sie einen Beitrag zur Pathogenese leistet, indem sie dem Bakterium das Eindringen in den Wirt und den Verdau von Wirtsproteinen erlaubt. Neben der Kollagenase beinhaltet das Enzymgemisch von Serva andere Enzyme, wie Clostripain, welches Peptide an Carboxylenden von Argininresten spaltet und neutrale, unspezifische Proteasen (Rawlings and Salvesen 2013; Rawlings and Salvesen 2013).

Der Verdau des Gewebes aus Speicheldrüsen männlicher Wistar-Ratten sowohl mit, als auch ohne Kollagenase, führte zu einer fast vollständigen Dissoziation in Einzelzellen und acinäre Strukturen, wobei sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den Zellen zeigten (Abbildung 19, Anhang: Abbildung 32). Jedoch wurden ohne einen enzymatischen Verdau signifikant weniger Zellen isoliert, da der Gewebsverband mechanisch nicht so stark aufgelöst werden konnte und größere Zellaggregate bei der anschließenden Filtration entfernt wurden (Abbildung 20). Direkt nach der Inkulturnahme konnte eine verlangsamte Adhäsion an die Zellkulturoberfläche beobachtet werden, im weiteren Kultivierungsverlauf

waren jedoch keine Unterschiede mehr in der Morphologie, im Wachstum oder der Stoffwechselaktivität der Zellen erkennbar (Anhang: Abbildung 32-34).

Insgesamt konnte mit den hier eingesetzten Methoden festgestellt werden, dass der enzymatische Verdau von Geweben zwar für eine größeren Zellausbeute sorgte, aber keinen Effekt auf den weiteren Verlauf der Kultivierung hatte (Tabelle 1).

Einen weitaus größeren Einfluss auf die Zellen hatte der Verdau mit Trypsin während der Subkultivierung der Zellen. Trypsin von PAA ist ein Gemisch dreier Verdauungsenzyme: Trypsin 1, 2 und 4, die im Pankreas als Vorstufe Trypsinogen synthetisiert und im Zwölffingerdarm durch das Enzym Enteropeptidase in ihre aktive Form umgewandelt werden. Trypsin ist eine Serinprotease, die spezifisch Peptidbindungen nach den Aminosäuren Arginin, Lysin und nach modifiziertem Cystein spaltet und so verschiedene Proteine der Extrazellulären Matrix, wie Laminin, Fibronectin oder Kollagen, verdaut (Rawlings and Salvesen 2013). Der Verdau von Zellen mit Trypsin hat zwei Effekte: Zum einen werden die Zellen von der Zellkulturoberfläche gelöst, indem Proteine der Extrazellulären Matrix verdaut werden, zum anderen werden die Verbindungen zwischen den Zellen abgebaut, wodurch eine Einzelzellsuspension entsteht.

Der Effekt des Trypsinverdaus während der Propagation wurde in Speicheldrüsenzellen untersucht, die mit Trypsin oder ohne Trypsin, durch Schaben, von der Zellkulturoberfläche gelöst wurden. Die Propagation ohne einen enzymatischen Verdau resultierte in der Bildung von Zellaggregaten (Abbildung 21), da mechanisch zwar die Verbindungen der Zellen zur Zellkulturoberfläche, nicht aber die Zell-Zell-Kontakte gelöst wurden. Diese Aggregate brauchten in der Regel bis zu einer Woche, um zu adhären, während enzymatisch behandelte Zellen innerhalb weniger Stunden adhären wurden. Gleichzeitig konnte ein großer Teil der unverdauten Zellen gar nicht adhären, starb und wurde beim Medienwechsel entfernt. Wenn die Aggregate anwuchsen, konnte beobachtet werden, dass erst eine Proliferation einsetzte, wenn die Zellen aus den Aggregaten auswuchsen und nicht mehr kontaktinhibiert waren.

Auch wenn die Zellen ohne Enzymverdau wesentlich länger brauchten, um zu adhären, zeigten sie über den betrachteten Zeitraum kein verändertes Wachstum (Anhang: Abbildung

35). Die Stoffwechselaktivität wies zunächst keine Unterschiede auf, verlangsamte sich in den nicht enzymatisch verdauten Zellen spätestens nach der dritten Propagation jedoch signifikant (Abbildung 22, Tabelle 1).

Es zeigte sich also, dass eine enzymatische Behandlung von Zellen während der Subkultivierung ihre Fähigkeit zur Adhäsion erhöht und somit sowohl die Proliferation, als auch die Stoffwechselaktivität der Zellen positiv beeinflusst.

Als nächstes wurde der Effekt der Kultivierung mit serumhaltigem Medium untersucht. *In vivo* werden Prozesse wie das Wachstum, die Zellteilung, das Überleben einer Zelle, der Metabolismus und die Differenzierung über ein komplexes Set an Faktoren gesteuert. Diese werden über Nährstoffe, Hormone oder das Stroma vermittelt. *In vitro* muss das Medium Teile dieser Funktionen übernehmen und Hormone, Nährstoffe, Bindeproteine und Adhäsionsfaktoren zur Verfügung stellen. Dies gelingt meist durch die Zugabe von Seren, die unter anderem Wachstumsfaktoren, Hormone, Aminosäuren, Cytokine, Proteine und Adhäsionsmoleküle enthalten (Barnes and Sato 1980; Keenan, Pearson et al. 2006; Schmitz 2009).

Trotz der wachstums- und adhäsionsfördernden Effekte, die Seren auf *in vitro* kultivierte Zellen haben, wird der Bedarf an serumfreien Zellkulturen immer größer. Zum einen, weil die genaue Zusammensetzung von Seren bis heute unbekannt ist, und von Spender zu Spender stark variiert, zum anderen wegen der Gefahr von Kontaminationen mit Krankheitserregern (Galbraith 2002; Keenan, Pearson et al. 2006). Auch für die Herstellung von Antikörpern oder rekombinanten Proteinen ist die Kultivierung mit Serum ungeeignet, da die im Serum enthaltenen Proteine und Antikörper erst durch besondere Reinigungsschritte entfernt werden müssten. Doch auch serumfreien Medien müssen zusätzlich mit Faktoren versetzt werden, die ein Überleben und Wachstum der Zellen sichern. Häufig genutzt werden hierfür Insulin, Transferrin, Selen (ITS) und Albumin. Insulin stimuliert die Glukose- und Aminosäure-Aufnahme in den meisten Zelllinien und wirkt mitogen. Transferrin vermittelt den Eisentransport und befreit das Medium von reaktiven Sauerstoffspezies und Peroxidasen. Selen ist ein Co-Faktor, der die Glutathionperoxidase aktiviert und somit ebenfalls zur Entfernung reaktiver Sauerstoffspezies beiträgt. Albumin

macht mit 60 % den größten Teil der im Serum enthaltenen Proteine aus und hat sowohl eine antioxidative als auch eine stabilisierende Wirkung (Barnes and Sato 1980; Keenan, Pearson et al. 2006; Francis 2010; Freshney 2010).

Für die Untersuchung des Effektes des Serumgehaltes auf die Zellen, wurden diese direkt nach der Isolation und während des gesamten Kultivierungszeitraums mit unterschiedlichen Serumanteilen kultiviert. Die herkömmliche Kultivierung erfolgte mit 10 % Serum im Kulturmedium. Zusätzlich wurden Zellen mit 5 % oder mit 1 % Serum kultiviert.

Bei einer Halbierung des Serumanteils waren noch genug Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren im Medium vorhanden, um das Überleben und das Wachstum der Zellen zu gewährleisten. In diesem Fall war weder die Stoffwechselaktivität der Zellen, noch das Wachstum von der Verringerung des Serums betroffen (Abbildung 26, Anhang: Abbildung 36) und auch die Morphologie der Zellen wies keine Veränderungen auf (Abbildung 23). Allerdings konnte mit Hilfe des Click-iT®-Proliferationsassays eine Halbierung der DNA-Synthese nachgewiesen werden, was zu einer verlangsamten Proliferation führte (Abbildung 24, Tabelle 1).

Wesentlich stärker war der Effekt des Serumentzuges auf die Zellen, wenn diese mit nur 1 % FKS kultiviert wurden. Erstens wurde ein wesentlich geringerer Anteil der eingesetzten Zellen adhärent und zeigt schon zu Beginn der Kultivierung eine abgerundete Morphologie (Abbildung 23). Zweitens konnten die Zellen nur über einen kurzen Zeitraum von ca. 39 Tagen kultiviert werden, erreichten keine Konfluenz und stellten ihren Metabolismus nach ca. 20 Tagen in Kultur ein (Abbildung 25). Spätestens zu diesem Zeitpunkt begannen die Zellen sich abzurunden und von der Zellkulturoberfläche zu lösen. Einen besonders starken Einfluss hatte die Kultivierung mit 1 % FKS auf die DNA-Synthese der Zellen. Durch den fast vollständigen Entzug des Serums waren nur noch 2,8 % der Zellen überhaupt in der Lage in den Zellzyklus einzugehen und neue DNA herzustellen (Abbildung 24). Ein Wachstum der Zellen war nicht nachweisbar. Vielmehr starben die Zellen bei der Kultivierung mit 1 % Serum, was auf den Entzug überlebensnotwendiger Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Nährstoffe zurückzuführen ist (Abbildung 26, Tabelle 1).

Für die Kultivierung von Zellen ist die Ergänzung des Mediums mit Seren, oder im Falle serumfreier Kultivierung mit Hormonen und anderen Faktoren, unabdingbar. Wie hier gezeigt werden konnte, hat der Serumgehalt des Mediums einen direkten Einfluss auf die Proliferation der Zellen und somit auf ihr Wachstum. Bei einer Kultivierung der Zellen mit weniger als 5 % FKS waren kaum noch Zellen proliferativ und der Entzug von adhäsionsfördernden Faktoren führte zu einer verminderten Adhärenz der untersuchten Zellen.

Der letzte Faktor, dessen Rolle für die Kultivierung von Zellen untersucht wurde, ist die Adhärenz. Abgesehen von hämatopoetischen Stammzellen und Krebszelllinien, wie Melanomzellen oder Tumorstammzellen aus oralen Plattenepithelkarzinomen, brauchen nahezu alle Zelllinien, die aus Vertebraten gewonnen werden können, ein Substrat, an das sie anhaften können (Klein, Xiang et al. 1984; Berk and Baltimore 2000; Chen, Chang et al. 2012). Die Bindung der Zellen an ein Substrat oder andere Zellen wird über Moleküle der Extrazellulären Matrix vermittelt, die in drei funktionelle Gruppen eingeteilt werden können: 1) Zellverbindungsmoleküle (CJM; *cell junction molecules*), die feste Verbindungen zwischen Zellen, wie Desmosomen oder *Tight junctions* vermitteln. 2) Zelladhäsionsmoleküle (CAM; *cell adhesion molecules*), die losere Verbindungen zwischen Zellen und der Extrazellulären Matrix erlauben. Dazu gehören Integrine, Selektine, Proteine der Immunglobulin Superfamilie (IgSF) und Cadherine. 3) Substratadhäsionsmoleküle (SAM; *substrate adhesion molecule*), die die Interaktion zwischen Zellen und Substraten vermitteln. Diese beinhalten Proteoglykane, Kollagen, Fibronectin, Laminin und Tenascin (Seong and Ashley 1974). Zusätzlich lassen sich die Adhäsionsmoleküle auf Grund ihrer Abhängigkeit von zweiwertigen Ionen weiter unterteilen: Während die Stabilität der extrazellulären Domänen von Cadherinen und Selektinen abhängig von Ca^{2+} ist, sind die Mitglieder der IgSF Ca^{2+} -unabhängig (Takeichi 1977; Berk and Baltimore 2000; Sotomayor and Schulten 2008).

Die Möglichkeit an ein festes Substrat zu adhären, hatte in den durchgeführten Untersuchungen den wohl gravierendsten Effekt. Um die Adhäsion zu verhindern, wurde dem Medium zum einen Kalzium entzogen, um für die Adhäsionsmoleküle essentielle zweiwertige Ionen zu entfernen, zum anderen wurde die Zellkulturoberfläche mit Agarose beschichtet (Takeichi 1977; Steward, Liu et al. 2011).

Während der Kultivierung in Suspensionskultur bildeten die Zellen, die nicht adhären konnten, Aggregate mit ihren Nachbarzellen. Diese Aggregate blieben bis zu 25 Tage stabil, danach begannen sie durchsichtige blasenartige Strukturen aus extrazellulärer Matrix auszubilden, in denen immer weniger Zellen zu erkennen waren, bis das Aggregat vollständig aufgelöst und keine bzw. fast keine Zellen mehr sichtbar waren (Abbildung 27, Abbildung 28). In den Aggregaten konnte keine Zellteilung beobachtet werden und nach einer Kultivierungsdauer von ca. vier Tagen sank die Stoffwechselaktivität der Zellen in Suspensionskultur signifikant ab, bis die Zellen schließlich nach zehn Tagen kaum noch Glukose verbrauchten, bzw. nach sechs Tagen die Laktatproduktion komplett einstellten (Abbildung 30). Nach einer Kultivierungsdauer von 37 Tagen konnten keine vitalen Zellen mehr in der Suspensionskultur nachgewiesen werden (Abbildung 29, Tabelle 1).

Die Tatsache, dass die Zellen in Suspension untereinander Aggregate bildeten, war besonders bemerkenswert, da durch den Entzug der zweiwertigen Ionen Zelladhäsionsmoleküle, wie Integrin, Cadherin und Selektin, keine Liganden mehr binden können und somit die Zell-Zell-Kontakte vermindert sein sollten. Mögliche Gründe hierfür sind, dass möglicherweise ein Gehalt von 0,06 mM CaCl_2 im Medium noch ausreichend für die Vermittlung der Zell-Zellkontakte ist, oder das andere, Ca^{2+} -unabhängige CAMs wie Mitglieder der IgSF oder Addressine, diese Kontakte vermittelten.

Zusammenfassend konnte also gezeigt werden, dass jeder der drei untersuchten Faktoren einen Effekt auf den Erhalt einer proliferativen Zellpopulation hat. Dabei hatte die Adhäsion an Zellkulturoberflächen den größten Einfluss auf die Zellpopulation, gefolgt von der Kultivierung mit serumhaltigem Medium. Der Entzug eines dieser beiden Faktoren, resultierte in dem Verlust der Adhärenz, einer Abnahme der Proliferation und schließlich im Tod der Zellen. Der Effekt, den der enzymatische Verdau auf die Zellpopulation hatte, war etwas geringer: Ohne einen Verdau mit Kollagenase oder Trypsin wurden weniger Zellen aus dem Gewebe isoliert und waren in ihrer Stoffwechselaktivität und Adhäsion eingeschränkt, diese waren aber dennoch proliferativ und konnten subkultiviert werden.

Tabelle 1: Wirkung unterschiedlicher Faktoren auf die Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen.

Faktor	Zellausbeute in der Präparation	Adhärenz	Bildung von Aggregaten	Proliferation	Stoffwechsel/Vitalität
Kollagenase	Mit Kollagenase: höhere Ausbeute	Ohne Kollagenase: verzögerte Adhärenz zu Beginn der Kultivierung	-	-	-
Trypsin	-	Ohne Trypsin: verzögerte Adhärenz zu Beginn jeder Passage	Ohne Trypsin: Aggregatbildung zu Beginn jeder Passage	Ohne Trypsin: verzögerte Proliferation	Ohne Trypsin: langsamerer Stoffwechsel
Serum (5 % FKS)	-	-	-	50 % weniger DNA-Synthese	-
Serum (1 % FKS)	-	Geringerer Anteil an adhärennten Zellen	-	94 % weniger DNA-Synthese	Keine Stoffwechselaktivität nach 20 Tagen
Adhärenz	-	Keine Adhärenz	Nicht adhärennt: Aggregate	Nicht adhärennt: keine Proliferation	Nicht adhärennt: keine Stoffwechselaktivität nach 6-10 Tagen

5.2 Untersuchungen zur Herkunft und Charakterisierung der stammzellartigen Zellpopulation

Neben der Frage, welche Faktoren die Entstehung der stammzellartigen Zellpopulation, die *in vitro* beobachtet werden kann, beeinflussen, sollte auch geklärt werden, ob diese Population durch *Selektion* einzelner proliferativer Stammzellen, oder durch *Instruktion* differenzierter Zellen, einen plastischeren Zustand anzunehmen, entstanden ist.

5.2.1 Das Pankreas als Stammzellquelle

Pankreatische Stammzellen und ihre Einsatzmöglichkeiten liegen schon seit einigen Jahren im Fokus der Forschung wie zum Beispiel für den Ersatz zerstörter β -Zellen in der Diabetes-Therapie (Cornelius, Tchernev et al. 1997; Ramiya, Maraist et al. 2000; Bonner-Weir and Sharma 2002; Kruse, Birth et al. 2004; Grapin-Botton 2005; Rapoport, Danner et al. 2009).

Bis heute wird sehr kontrovers diskutiert, welches Ursprungsgewebe die multi- oder pluripotenten Zellen haben, die aus dem Pankreas gewonnen werden können. Als mögliche Bereiche, in denen pankreatische Stammzellen vorkommen können, wurden sowohl die endokrinen, als auch die exokrinen Bereiche des Pankreas und das Epithel der Ausführungsgänge vorgeschlagen.

Die Bauchspeicheldrüse ist ein zwischen Magen, Milz und Zwölffingerdarm (*Duodenum*) liegendes Organ mit einer dualen Funktion. Zum einen besteht sie aus einem kleinen endokrinen, Hormone produzierenden Teil, zum anderen besitzt sie eine exokrine, verdauungsenzym-synthetisierende Funktion.

Die endokrinen Zellen sind in kleinen, zwischen den exokrinen Zellen gelegenen Einheiten, den Langerhans'schen Inseln, organisiert und bestehen aus fünf Zelltypen. Sie produzieren Hormone für die Regulation des Blutzuckerspiegels und die Regulation der Sekretion von Wachstumshormonen. Dazu zählen die Glucagon produzierenden α -Zellen, β -Zellen, die für die Insulinproduktion verantwortlich sind, δ -Zellen, die Somatostatin herstellen, Pankreatisches Polypeptid synthetisierende PP-Zellen und ϵ -Zellen, die Ghrelin produzieren (Bockman 1993). Die endokrinen Zellen machen etwa 1-1,5 % der gesamten Zellmasse des Organes aus (Nussey and Whitehead 2001).

Der exokrine Teil des Pankreas macht mit über 95 % den weitaus größeren Anteil des Pankreas aus (Harding, Zeng et al. 2001). Er setzt sich aus kleinen Einheiten, den sogenannten Acini (*Acinus*: lat. Beere, Traube), und ihren Ausführungsgängen zusammen. Die Acini stellen den funktionalen Anteil des exokrinen Pankreas dar und synthetisieren Verdauungsenzyme, wie Amylase, Trypsinogen und Elastase, die in Form von Zymogenkörnern in den Zellen gespeichert werden. Die produzierten Verdauungsenzyme können über die Ausführungsgänge, die in die Acini münden und über Schaltstücke miteinander verbunden sind, sezerniert werden (Bockman 1993).

Eine mögliche Quelle für adulte Stammzellen im Pankreas sind die Langerhans'schen Inseln. Zulewski et al. beschrieben eine Population von Nestin-positiven Zellen, die sogenannten NIP-Zellen (*Nestin-positive islet-derived progenitor cells*), die sowohl in den Langerhans'schen Inseln, als auch in den pankreatischen Gängen vorkommen. Diese Zellen weisen weder endokrine Hormone, noch vaskuläre Endothel-Marker oder Gang-spezifische

Marker wie Ck19 auf. Auch wenn Nestin als Marker für neurale Stammzellen gilt, konnten keine weiteren Neuronen-spezifische Marker in diesen Zellen gefunden werden. *In vitro* war die Zellpopulation proliferativ und konnte sowohl in Leberzellen, als auch in exokrine, endokrine Pankreaszellen und Gangepithelzellen differenziert werden (Zulewski, Abraham et al. 2001).

Auch Seaberg et al. beschrieben das Vorkommen von proliferativen Vorläuferzellen in den Langerhans'schen Inseln und dem Gangepithel, die *in vitro* Kolonien bildeten und neurale und pankreatische Marker co-exprimierten. Diese PMP-Zellen (*pancreas-derived multipotent precursors*) hatten ein limitiertes Selbsterneuerungspotential und konnten in Neuronen, Gliazellen, endokrine und exokrine Pankreaszellen und in Pankreassternzellen differenziert werden (Seaberg, Smukler et al. 2004). Im Gegensatz zu Zulewski et al. konnten hier keine Unterschiede zwischen Nestin⁺- und Nestin⁻-Zellen und auch keine Differenzierung in Epithel- oder Leberzellen beobachtet werden.

Bonner-Weir et al. berichteten von der Fähigkeit der pankreatischen Gangepithelzellen als fakultative Stammzellen sowohl endokrine, als auch exokrine Zelltypen aus sich hervorgehen zu lassen. Sie beobachteten nach einer Pankreatektomie zunächst eine Zunahme von Inselzellen in der Nähe neu gebildeter Gänge, jedoch keine Vergrößerung bereits bestehender Inseln. Zudem konnten sie zeigen, dass 24 Stunden nach der partiellen Entfernung des Pankreas der Gehalt an DNA-synthetisierenden, BrdU-positiven Zellen in den verbliebenen Gängen signifikant anstieg und nach drei Tagen fast alle Gangepithelzellen PDX-1 exprimierten. In einem globalen Vergleich konnte eine ähnliche Genexpression in Gangepithelzellen und neu gebildeten Inselzellen festgestellt werden (Bonner-Weir, Toschi et al. 2004).

Auch aus dem exokrinen, acinären Gewebe des Pankreas konnten bereits Stammzellen isoliert werden. Diese sogenannten pankreatischen Sternzellen (PSC) machten 3,99 % der gesamten Zellmasse des Pankreas aus, waren um exokrine Zellen herum angeordnet und wiesen große Ähnlichkeiten zu hepatischen Sternzellen auf. Die Zellen konnten vor allem aus Pankreata mit akuter Pankreatitis gewonnen werden und wiesen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf. *In vivo* konnten die PSCs in interlobulären Septen und interacinären

Regionen nachgewiesen werden (Apte, Haber et al. 1998; Bachem, Schneider et al. 1998; Kruse, Hildebrand et al. 2001; Jaster, Sparmann et al. 2002).

Kruse et al. konnten aus dem exokrinen Pankreasgewebe sogenannte PSLCs (*pancreas stellate like cells*) isolieren. Diese Zellen zeigten eine nahezu unbegrenzte Selbsterneuerung und die Fähigkeit zur Bildung komplexer Aggregate (*Organoid Bodies*, OBs) mit einer mehrschichtigen epithelialen Oberfläche und zentralen kanalähnlichen Strukturen. Sowohl zweidimensional gewachsene, klonale Zellpopulationen, als auch OBs, waren in der Lage, ähnlich wie embryonale Stammzellen, spontan in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. So konnten ektodermale Marker, wie PGP 9.5, Neurofilamente, S100 und Cytokeratine, mesodermale Marker, wie α -SMA, Collagen II, Proteoglykane und Vigilin, und endodermale Marker, wie Amylase, Glucagon und Insulin nachgewiesen werden (Kruse, Birth et al. 2004; Kruse, Kajahn et al. 2006). Interessanterweise konnte ein ganz ähnlicher Zelltyp auch in der Unterkieferspeicheldrüse (*Glandula Submandibularis*) und der Ohrspeicheldrüse (*Glandula Parotis*) gefunden werden (Kruse, Birth et al. 2004; Gorjup, Danner et al. 2009).

Andere Arbeitsgruppen berichten wiederum von mobilen Zellen, wie beispielsweise mesenchymalen Stammzellen (MSC), die im Zuge der Gewebshomöostase in das Gewebe einwandern und somit die eigentliche Stammzell-Quelle darstellen (Ianus, Holz et al. 2003; Lin, Chiou et al. 2006; Seeberger, Dufour et al. 2006).

Zudem wird hinterfragt, ob die Gewebshomöostase und die Regeneration von geschädigtem Pankreasgewebe überhaupt durch Stammzellen oder Progenitorzellen vermittelt wird, oder ob es nicht die differenzierten Zellen selbst sind, die zur Replikation fähig sind (Finegood, Scaglia et al. 1995; Dor, Brown et al. 2004).

Auch Rapoport et al. beschrieben die Beteiligung differenzierter Zellen an der Entstehung einer Stammzellpopulation: Sie beobachteten *in vitro* die Dedifferenzierung terminal differenzierter exokriner Zellen in eine heterogene Population von Zellen mit Stammzeleigenschaften. Diese Zellen waren über einen langen Zeitraum proliferativ und in der Lage, spontan in Zellen aus mindestens zwei Keimblättern zu differenzieren. Über den Kultivierungszeitraum konnte hier beobachtet werden, dass die Expression

pankreasspezifischer Proteine, wie Amylase, Insulin und PDX1, stark abnahm, während die Expression von Stammzellmarkern wie Nestin und Oct-4 anstieg (Rapoport, Schick Tanz et al. 2009).

5.2.2 Charakterisierung der Zellpopulation aus dem Pankreas

Um das Schicksal der terminal differenzierten exokrinen Pankreaszellen nach ihrer Isolation aus dem Gewebe zu verfolgen und den Ursprung der *in vitro* beobachtbaren Zellpopulation zu ergründen, wurde zunächst die entstehende Zellpopulation auf RNA- und Proteinebene charakterisiert (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15, Anhang: Tabelle 6, 7, 8, Abbildung 30, 31).

Die Untersuchung pankreasspezifischer Marker zeigte auf RNA- und Proteinebene, dass sowohl die Expression funktioneller Proteine, wie Amylase und Elastase, als auch die Expression von PDX1, einem für die Pankreasidentität spezifischem Protein, eingestellt wurde und die Zellen ihren pankreatischen Phänotyp verloren.

Um die spontane Differenzierung der Zellpopulation in ektodermale Zellen nachzuweisen, wurden die kurzen, mittleren und langen Ketten von Neurofilamenten untersucht. In keiner der Proben konnte eine Expression der schweren Kette der Neurofilamente nachgewiesen werden. Auf RNA-Ebene konnte eine Expression der leichten und mittleren Ketten zu Beginn der Kultivierung gezeigt werden, die im weiteren Verlauf abnahm. Im Herkunftsgewebe wurden keine Neurofilamente exprimiert. In der Immunfluoreszenz konnte ein geringer Anteil von 1-2 % der Zellen als NFL-positiv identifiziert werden. Auffällig war hier ein relativ hoher Anteil an NF-L-positiven Zellen im frischen Isolat. Dies liegt daran, dass das Pankreas von Nerven des vegetativen Nervensystems durchzogen wird (Bockman 1993).

Die Ergebnisse der quantitativen PCR für die Gene AMY1, NFL, NFM und NFH decken sich nicht in allen Punkten mit den Ergebnissen der Gelelektrophorese. Zum Teil konnte die Expression dieser Gene in der quantitativen PCR nicht gezeigt werden, ließ sich in der Gelelektrophorese aber dennoch nachweisen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in der quantitativen PCR relative Veränderungen in der Genexpression gemessen werden, die Banden in der Gelelektrophorese dagegen mit der absoluten Menge an Transkripten

korreliert. Zudem werden in der qPCR Gene, die einen bestimmten Schwellenwert erst nach 35 PCR-Zyklen übersteigen, nicht mehr in die Wertung einbezogen. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese zeigen jedoch den Zustand nach 42 PCR-Zyklen.

Als Marker für eine mesodermale Differenzierung der Zellen wurde α -SMA genutzt, dessen Expression nach der Inkulturnahme drastisch anstieg und in allen untersuchten Passagen in unterschiedlich starker Ausprägung nachgewiesen werden konnte.

Die Expression des epithelialen Markers CK18 wurde auf Proteinebene sowohl in den frisch isolierten, als auch in den kultivierten Zellen nachgewiesen. Ck18 wird *in vivo* sowohl im Gangepithel als auch in acinären Zellen exprimiert (Schussler, Skoudy et al. 1992). Durch die Inkulturnahme gab es zunächst einen leichten Anstieg der Expression auf 35,6 % in P0, diese fiel aber in Passage 5 auf 9,5 %. Die adhärent wachsenden Zellen, die Cytokeratin 18 exprimierten, waren in Form von Zellclustern angeordnet.

Die Proliferation wurde mit Hilfe von Ki67 bestimmt, welches in der quantitativen PCR in allen untersuchten Proben gezeigt werden konnte, nach der Inkulturnahme aber sank. Dies war auffällig, da eine Proliferation der Zellen im Gewebe nur im Rahmen der Gewebshomöostase stattfindet und somit nur einen sehr geringen Anteil der Zellen betrifft, wohingegen sich die kultivierten Zellen durch eine stetige Proliferation auszeichnen. Mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung konnte dies auf Proteinebene bestätigt werden. Hier lag der Anteil an proliferativen Zellen bei 0,35 % im Gewebe und stieg auf 18 % in der Zellkultur an.

Als Marker für eine Pluripotenz der Zellen wurde KLF4 eingesetzt (Takahashi and Yamanaka 2006). Dieser Transkriptionsfaktor konnte nur auf RNA-Ebene nachgewiesen werden, wobei die Inkulturnahme der Zellen zu einer drastischen Reduktion der Expression führte.

Zudem wurden Nestin und Nucleostemin als Marker für Stammzellen eingesetzt. Die Expression von Nucleostemin konnte nach fünf Passagen für 42 % der Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von Nestin konnte in der Immunfluoreszenzfärbung am Ende der Passage 0 gezeigt werden, wo sie einen Anteil von 17 % ausmachte. Nach fünf Passagen in Kultur fiel der Anteil Nestin-positiver Zellen auf 6,6 %. In der PCR hingegen konnte ein sukzessiver Abfall der Nestinexpression über den Kultivierungszeitraum beobachtet werden.

Die Expression von Nestin im Pankreas wurde bereits von anderen Autoren gezeigt, die eine Beteiligung dieser Zellen an der Neogenese von endokrinen Zelltypen vermuten (Zulewski, Abraham et al. 2001). Andere Stammzellmarker, wie Oct-4, Nanog und Sox2 konnten in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden.

Erste Hinweise darauf, dass ein Teil der Zellpopulation durch eine Instruktion terminal differenzierter Zellen entstanden sein muss, lieferten Zeitrafferaufnahmen, die während der ersten sieben Tage in Kultur angefertigt wurden (Abbildung 12). Wie auch schon von Rapoport et al. (Rapoport, Schick Tanz et al. 2009) gezeigt wurde, konnte hier beobachtet werden, dass die kultivierten Acini zunächst an der Zellkulturoberfläche adhärten, im Laufe der Kultivierung nach und nach Zellen aus sich hervorgehen ließen und einen zweidimensionalen Zellrasen bildeten. So konnte gezeigt werden, dass die Zellpopulation nicht nur aus einzelnen, stammzellartigen Zellen entstanden ist, sondern dass terminal differenzierte Zellen einen großen Teil der Population zum Ende der Passage 0 ausmachen.

5.2.3 Untersuchungen zur Herkunft der proliferativen Zellpopulation

Die weitere Untersuchung der Herkunft der stammzellartigen Zellpopulation wurde mit Hilfe eines Mausstammes durchgeführt, dessen exokrine Pankreaszellen mit Hilfe eines Cre-LoxP-Reportersystems stabil markiert waren. Bei diesem Reportersystem wird die Cre-Rekombinase durch einen Elastase1-Promotor, der spezifisch für exokrine Acini ist, reguliert. Diese Rekombinase wird in Zellen, in denen das Verdauungsenzym Elastase exprimiert wird, synthetisiert und kann dort eine von loxP-Sites flankierte Stopp-Sequenz, die einem LacZ-Gen vorgeschaltet ist, schneiden. Wird die Stopp-Sequenz aus dem Reporterkonstrukt herausgeschnitten, kann die Expression der vom LacZ-Gen codierten β -Galactosidase nachgewiesen werden. Eine zeitliche Induktion des Reportersystems ist über die Bindung einer modifizierten Ligandenbindungsdomäne von Estrogen-Rezeptoren an die Rekombinase gewährleistet. Durch die Bindung von synthetischem Tamoxifen kommt es zu einer Translokation der Rekombinase in den Zellkern, wo sie das Reporterkonstrukt schneiden kann (Abbildung 3).

Die erfolgreiche Aktivierung des Reportersystems und die damit einhergehende Markierung der exokrinen Acini konnte im pankreatischen Gewebe und in 41,5 % der isolierten Acini nachgewiesen werden (Abbildung 16, Abbildung 18). In 58,5 % der Zellen konnte das Reporterkonstrukt durch die Tamoxifengabe jedoch nicht induziert werden (Abbildung 16 B, langer Pfeil). In Gangzellen, die zwar exokrinen Ursprungs sind, jedoch keine Elastase exprimieren, wurde das Reportersystem ebenfalls nicht aktiviert (Abbildung 16 C, Pfeil).

Die Expression der vom LacZ-Gen codierten β -Galactosidase wurde über einen Kultivierungszeitraum von fünf Passagen untersucht. Die Expression konnte hierbei in allen untersuchten Passagen nachgewiesen werden, nahm jedoch mit der Dauer der Kultivierung ab (Abbildung 17, Abbildung 18, Anhang: Tabelle 9). Direkt nach der Isolation der Zellen lag der Anteil an positiven Zellen bei 41,5 % und auch am Ende der Passage 0 konnte die β -Galactosidase noch in 16,9 % der Zellen nachgewiesen werden. Wie in der globalen Genexpressionsanalyse gezeigt werden konnte, hatte zu diesem Zeitpunkt die gesamte Population ihre Genexpression schon an die Kultivierungsbedingungen angepasst und diese veränderte sich im weiteren Verlauf der Kultivierung auch nicht mehr. Dies wäre zu erwarten, wenn ein Zelltyp einen anderen aus der Kultur verdrängen würde. Das spricht dafür, dass ein großer Teil der Zellen durch *Instruktion* entstanden sein muss. Zudem war die Markierung der Ausgangspopulation nicht zu 100 % erfolgreich und ein nicht zu vernachlässigender Anteil von 58,5 % der Acini konnte hier nicht induziert werden.

Doch auch wenn davon ausgegangen würde, dass die Markierung der exokrinen Zellen zu 100 % erfolgreich gewesen wäre und alle nicht markierten Zellen nicht acinären Ursprungs wären, müsste man noch von einem nicht geringen Anteil an Zellen ausgehen, die durch Instruktion entstanden sind.

Im Verlauf der Passagen 1 - 4 schwankte der Anteil an positiven Zellen zwischen 10,2 und 28,4 %. Nach fünf Passagen in Kultur lag der Anteil an β -Galactosidase exprimierenden Zellen bei nur noch 1,76 %.

Die Tatsache, dass der Anteil an LacZ-positiven Zellen über die Kultivierungsdauer abnahm, könnte dafür sprechen, dass durch die Kultivierung ein seltener Stammzelltyp selektiert wurde, der nach und nach die exokrinen Zellen überwuchs. Es lässt sich jedoch dagegen

halten, dass die Ausgangspopulation nicht zu 100 % mit Hilfe des Reportersystems markiert und somit nur das Schicksal von 41,5 % der Zellen verfolgt werden konnte. Ein gewisser Teil der LacZ-negativen Zellpopulation kann also auch aus nicht markierten exokrinen Zellen entstanden sein, der durch das Fehlen der Markierung einen proliferativen Vorteil besitzt. Eine andere mögliche Erklärung für die Abnahme der markierten Zellen kann ein *gene-silencing*, zum Beispiel durch eine homologe Rekombination der flankierenden Regionen, sein (Schulz, Glaubitz et al. 2007).

5.3 Globale Genexpressionsanalyse

Um einen tieferen Einblick in die Vorgänge zu erhalten, die zur Entstehung einer proliferativen stammzellartigen Zellpopulation führen, wurde eine globale Genexpressionsanalyse durchgeführt. In dieser sollte die Anpassung der ursprünglich terminal differenzierten Zellen an die veränderten Umgebungsbedingungen über einen Kultivierungszeitraum von 13 Passagen gezeigt und auf eine mögliche physiologische Funktion dieser Veränderungen hin untersucht werden.

Die Genexpressionsanalyse wurde für acht Gewebeproben und drei murine Pankreaszelllinien durchgeführt, wobei für jede Probe die Expression von mehr als 28.000 codierenden Transkripten und über 7.000 nicht codierenden intergenen Transkripten analysiert wurde. Zunächst wurde durch ein hierarchisches Clustering und eine Hauptkomponentenanalyse deutlich, dass die Inkulturnahme der Zellen eine drastische Änderung der Genexpression zur Folge hatte, sich die Expression der Gene im Laufe der Kultivierung dagegen aber kaum noch änderte (Abbildung 6).

Dies wurde umso deutlicher, wenn die Expressionsänderung von einem Zeitpunkt der Kultivierung zum nächsten betrachtet wurde. Die stärkste Veränderung der Genexpression zeigte sich zwischen dem Gewebe und den Zellen in der Passage 0, also direkt nach der Inkulturnahme. Für diesen Zeitraum konnten 879 signifikant differenziell hoch regulierte ($p \leq 0,05$; $F_c \geq 2$) und 594 signifikant herunter regulierte ($p \leq 0,05$; $F_c \leq 0,5$) Gene identifiziert werden. Zwischen den Passagen 0 und 1 gab es hingegen nur eine moderate Änderung der

Genexpression, während in den folgenden Passagen die Expression weitestgehend stabil blieb (Abbildung 7).

Die weitere Untersuchung der zwischen Gewebe und Primärkultur differenziell exprimierten Gene zeigte eine starke Abnahme der Gene, die für die Pankreasidentität, wie beispielsweise PDX1 und GATA4, die in der frühen Pankreasentwicklung aktiv sind, und für die Pankreasfunktion, wie Lipasen und Proteasen, die in diesem Organ synthetisiert werden, notwendig sind (Abbildung 8).

Eine wichtige Frage, die durch die globale Genexpressionsanalyse der Zellen beantwortet werden sollte, war, ob die Reaktion der Zellpopulation auf die Inkulturnahme einen Prozess widerspiegelt, der so auch im Organismus beobachtet werden kann. Beispielsweise wäre es denkbar gewesen, dass durch den Verlust der Gewebeintegrität eine Immunantwort oder eine Entzündungsreaktion, wie in einer Pankreatitis, in den Zellen hervorgerufen würde. Die Kategorisierung der differenziell exprimierten Gene mittels *Go-Miner* zeigte jedoch, dass Gene vieler verschiedener biologischer Kategorien, wie einer Immunreaktion, Signalprozessen oder einer Antwort auf Stimuli, sowohl hoch, als auch herunter reguliert wurden (Abbildung 9).

Die Betrachtung der differenziell exprimierten Gene erlaubte folglich keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine physiologische Funktion der Prozesse, die während der Inkulturnahme ablaufen. Das deutet darauf hin, dass die Zellen sich sehr wohl bekannter Mechanismen bedienen, diese aber außerhalb des Organismus anders miteinander kombinieren. Die veränderte Genexpression ist also vielmehr eine Anpassung der Zellen an die neuen Umgebungsbedingungen, der keine biologische Funktion zukommt.

Die Geschwindigkeit, mit der Zellen ihre Genexpression an die *in vitro*-Kultur anpassen, war überraschend hoch und wurde mit Hilfe einer quantitativen PCR weiter untersucht. Hierbei wurde die relative Expression von 15 ausgewählten Genen für frühe Zeitpunkte der *in vitro*-Kultivierung bestimmt und mit der *in vivo* Situation verglichen. Dafür wurden zum einen Gene ausgewählt, die spezifisch für exokrine Pankreaszellen sind, zum anderen wurden Gene betrachtet, die in der globalen Genexpressionsanalyse eine besonders starke differenzielle Expression zeigten.

Bereits in der globalen Genexpressionsanalyse war eine schnelle Anpassung der Genexpression an die Kultivierungsbedingungen sichtbar geworden. Durch die Analyse der Expression nach 24, 48 und 72 Stunden wurde allerdings deutlich, dass diese Anpassung viel schneller vonstattengeht, als bisher angenommen. So verloren die untersuchten exokrinen Pankreaszellen schon 24 Stunden nach der Inkulturnahme ihre pankreatische Funktion und Identität (Abbildung 10, Anhang: Abbildung 5-8). Zwar konnte in der quantitativen PCR eine Abnahme der Genexpression von GATA4 und AMY1 gezeigt werden, jedoch zeigt die Analyse der PCR-Produkte durch die Gelelektrophorese, dass beide Gene auch in den höheren Passagen noch von den Zellen exprimiert werden. Diese Diskrepanz in den Ergebnissen lässt sich wiederum dadurch erklären, dass in der quantitativen PCR relative Veränderungen in der Genexpression gemessen werden, die Banden in der Gelelektrophorese dagegen mit der absoluten Menge an Transkripten korreliert. Die Expression dieser Gene ist also im Vergleich zur Expression im Gewebe drastisch gesunken, aber nicht komplett erloschen.

Auch bei den in der globalen Genexpressionsanalyse hochregulierten Genen konnte in der quantitativen PCR eine frühzeitige Regulation gezeigt werden (Abbildung 11). So wurde die Expression einiger untersuchter Gene erst durch die Inkulturnahme der Zellen induziert. Hierzu zählten der Transkriptionsfaktor FOSL1, der zusammen mit Mitgliedern der JUN-Familie den Transkriptionsfaktor Aktivator Protein 1-Komplex (AP 1) bildet und somit Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose reguliert (Young and Colburn 2006), das durch den Wnt-Signalweg induzierte Gen WISP1 (Xu, Corcoran et al. 2000) und das Gen IL-6, das für die Regulation der Immunantwort in einer Akute-Phase-Reaktion verantwortlich ist (Heinrich, Behrmann et al. 2003).

Die Expression einiger anderer Gene stieg ebenfalls nach 24 Stunden in Kultur: Darunter waren der adhäsionsfördernde Wachstumsfaktor CTGF (Chen, Abraham et al. 2004), RIPK3, das Nekrose aktiviert (Moujalled, Cook et al. 2013), TIMP1, ein Inhibitor von Matrix-Metalloproteasen, die wiederum an der Umgestaltung der Extrazellulären Matrix beteiligt sind (Lambert, Dasse et al. 2004) und HMGA2, ein Transkriptionsfaktor, der sowohl in Stammzellen, als auch in Tumorzellen aktiviert ist und den Zellzyklus über das Cyklin A2 reguliert (Natarajan, Hombach-Klonisch et al. 2013).

Col12a1, ein fibrilläres Kollagen (Gordon and Olsen 1990) und der Wachstumsfaktor FGF7, der mitogene Eigenschaften hat (Finch and Rubin 2006), wurden nach einer Kultivierungsdauer von 48 Stunden signifikant verstärkt exprimiert. Eine erhöhte Expression des Kollagens Col8a1 und des mesodermalen Markers ACTA2 konnte erst gegen Ende der Passage 0 beobachtet werden.

Insgesamt konnte demnach gezeigt werden, dass Zellen, die aus dem Organismus entnommen und *in vitro* kultiviert werden, innerhalb von weniger als 48 Stunden ihren ursprünglichen Phänotyp verlieren, ihre Genexpression an die Kultivierungsbedingungen adaptieren und diese Adaption keinen einzelnen physiologischen Prozess widerspiegelt. Stattdessen werden Teile unterschiedlicher Prozesse miteinander kombiniert, die sich gegenseitig beeinflussen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben einen Aufschluss über die Vorgänge, die während der Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen ablaufen. Die Inkulturnahme der exokrinen Pankreaszellen resultierte im Erhalt einer stammzellartigen Zellpopulation. Dabei stellt sich die Frage, welche Art von Zellen den Ursprung dieser Population darstellt. Sind es (1) bereits existierende Stammzellen, die in den endokrinen oder exokrinen Bereichen des Pankreas vorkommen und durch die *in vitro*-Kultivierung selektiert werden oder (2) differenzierte Zellen, die durch die *in vitro*-Kultivierung instruiert werden, einen plastischeren Zustand anzunehmen?

Gegen eine Selektion bereits existierender Stammzellen spricht, dass das Pankreas zu mehr als 95 % aus exokrinen und zu 1 - 1,5 % aus endokrinen Zellen besteht (Harding, Zeng et al. 2001; Nussey and Whitehead 2001). Selbst wenn andere Zelltypen, wie die Endothelzellen der Blutgefäße, oder Nervenzellen vernachlässigt würden, könnten Stammzellen nur einen Anteil von 3,5 % der Ausgangspopulation ausmachen. Zusätzlich wurde der Anteil der exokrinen Zellen durch das Isolationsprotokoll noch weiter erhöht. In der *Time-lapse*-Analyse konnte gezeigt werden, dass die exokrinen Acini zu Beginn der Kultivierung in der Zellkulturschale anhaften und Zellen aus ihnen auswachsen, die den überwiegenden Teil der Zellpopulation stellen. Zudem sprechen die Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalyse gegen die Theorie, dass Stammzellen in der Zellkultur die wesentlich größere exokrine

Zellfraktion überwachsen. Würden Stammzellen die exokrinen Zellen langsam überwachsen, würde man mit einer langsamen, aber stetigen Änderung der Genexpression rechnen. Stattdessen kann in der Genexpressionsanalyse eine drastische Änderung der Expression schon 24 bis 48 Stunden nach der Inkulturnahme beobachtet werden, die im weiteren Verlauf der Kultivierung weitestgehend stabil bleibt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass nicht Stammzellen, sondern terminal differenzierte exokrine Zellen den Ursprung der stammzellartigen Zellpopulation bilden. Diese werden durch die Inkulturnahme instruiert, eine größere Plastizität zu entwickeln.

Aber auch wenn diese Ergebnisse für einen größeren Anteil an *Instruktion* während der Inkulturnahme sprechen, spielen sowohl *Instruktion*, als auch *Selektion* eine Rolle in diesem Prozess. Bei der Inkulturnahme von Zellen gibt es zunächst eine *Selektion* von Zellen, die in der Lage sind, an die Zellkulturplastik zu adhären. Im weiteren Verlauf der Kultivierung gibt es eine *Selektion* auf Proliferation. Gleichzeitig ermöglicht erst die *Instruktion* den vormals differenzierten Zellen, adhären zu werden und wieder in den Zellzyklus einzutreten.

Die Ergebnisse der globalen Genexpressionsanalyse geben zusätzlich einen Aufschluss darüber, ob die Prozesse, die in der Zellkultur beobachtet werden können, vergleichbar mit organismischen Prozessen sind, oder ob stattdessen gut reproduzierbare Artefakte betrachtet werden. Die Analyse der durch die Inkulturnahme differenziell regulierten Gene und ihrer Funktionen zeigte, dass die Anpassung der Zellen an die *in vitro*-Kultur keine Wiederholung physiologischer Prozesse, sondern ein zwar reproduzierbares, aber dennoch von organismischen Prozessen losgelöstes, eigenständiges Phänomen ist. Zusammen mit der Beobachtung, dass Zellen durch die Inkulturnahme ihre Differenzierung verlieren, bestätigt dies die Annahme, dass in der Zellkultur reproduzierbare Artefakte betrachtet werden. Als Artefakte der Zellkultur können Zellen angesehen werden, die ihren Phänotyp erst durch die Kultivierung erlangen und kein Pendant im Organismus besitzen. Hansson et al. beschrieb bereits 2007 für embryonale Stammzellen, dass diese ein Kulturartefakt darstellen, welches ein verändertes epigenetisches Imprinting und somit kein Äquivalent im Embryo besitzt (Hansson, Helgesson et al. 2007).

Die Tatsache, dass die *in vitro* kultivierten Zellen einen artifiziellen, an die Zellkultur angepassten und *in vivo* nicht vorkommenden Zelltypen darstellen, macht es umso notwendiger, prinzipiell die Technik der *in vitro*-Kultivierung für bestimmte Fragestellungen zu überdenken und früher erzielte Ergebnisse eingehend zu prüfen. Diese Methode eignet sich zwar für Untersuchungen von Prozessen, die innerhalb einer Zelle ablaufen und für die Produktion von Zellkomponenten, wie Proteine und Antikörper, jedoch nicht für Untersuchungen, die eine Differenzierung der Zellen voraussetzen, oder für die Analyse der organismischen Kooperation.

Dennoch bietet die Möglichkeit, ein reproduzierbares und steuerbares Artefakt *in vitro* herzustellen auch Chancen. So ist es denkbar, dass der Verlust der Differenzierung und die damit einhergehende höhere Plastizität der Zellen, gerade in der Klinik von Vorteil sein kann. Hier könnten Patienten Zellen, beispielsweise aus der Haut oder ihren Anhangsdrüsen, entnommen, *in vitro* vermehrt und nach einer gerichteten Differenzierung wieder reimplantiert werden. Bislang wurden für klinische Aspekte meist mesenchymale Stammzellen genutzt, die entweder durch eine Knochenmarkentnahme aus dem Beckenkamm isoliert werden, was eine Vollnarkose voraussetzt, oder durch eine periphere Blutstammzellspende, nach Gabe des Hormones G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) angereichert werden, was zu grippeähnlichen Symptomen führen kann (Kassis, Zangi et al. 2006). Die Möglichkeit, Zellen schmerzfrei und ohne die Gabe von Medikamenten zu entnehmen, zu vermehren und sie nach einer gezielten Differenzierung wieder in den Körper einzubringen bedeutet einen großen Fortschritt für die Stammzelltherapie.

6. Fazit und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Inkulturnahme und Kultivierung von adhärent wachsenden Zellen untersucht. Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inkulturnahme von exokrinen, terminal differenzierten Zellen dazu führt, dass sich die Genexpression der gesamten Zellpopulation drastisch ändert, was wiederum eine größere Heterogenität der Population und den Verlust ihrer Differenzierung bedingt. Gleichzeitig werden Gene ganz unterschiedlicher biologischer Funktionen und Regelnetzwerke differenziell exprimiert. Dadurch ist das Muster dieser Regulation durch keinen bekannten organismischen Prozess allein beschreibbar; stattdessen scheinen Teile unterschiedlicher Prozesse neu miteinander kombiniert zu werden und einander zu beeinflussen.

Des Weiteren sprechen sowohl die Beobachtungen der *Time-lapse*-Analyse, dass terminal differenzierte exokrine Acini nach der Inkulturnahme adhärieren und Zellen aus ihnen auswachsen, die den größten Teil der Primärkultur ausmachen, als auch die Entdeckung, dass die Genexpression schon innerhalb von 48 Stunden an die Kultivierungsbedingungen angepasst wird, für eine *Instruktion* der gesamten Zellpopulation einen plastischeren Zustand anzunehmen.

Ein Verlust der Differenzierung von Zellen *in vitro* stellt sich als besonders problematisch für Untersuchungen dar, die eine Differenzierung der Zellen voraussetzen, beziehungsweise für die Analyse organismischer Kooperationen. In folgenden Experimenten könnte versucht werden, bestimmte Schlüssel-Gene, die für die Dedifferenzierung der Zellen verantwortlich sind, zu identifizieren und durch einen gezielten *knock-out* die Dedifferenzierung der Zellen zu verhindern.

In einem weiteren Experiment konnte durch die stabile Markierung der exokrinen Pankreaszellen über ein Reportersystem zudem das Schicksal der terminal differenzierten Pankreaszellen verfolgt werden. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Zellen in der Lage waren, in der Zellkultur zu adhärieren und propagiert zu werden. Die Zellen waren über einen Kultivierungszeitraum von fünf Passagen beobachtbar, der Anteil an markierten Zellen nahm jedoch stetig ab. Da es nicht möglich war, 100 % der exokrinen Zellen zu markieren, kann abschließend nicht eindeutig festgestellt werden, ob ein Überwachsen der Zellen durch

andere Zelltypen, oder ein proliferativer Nachteil der Zellen gegenüber nicht markierten Zellen der Grund für ihre Abnahme ist. In folgenden Experimenten könnte dies zum einen durch den Einsatz eines Reportersystems gelöst werden, der einen größeren Anteil an Zellen stabil markiert (Magnuson and Osipovich 2013) oder durch den Einsatz eines Reportergens, wie z.B. GFP (*green fluorescent protein*), das in lebenden Zellen nachgewiesen werden kann. In diesem Fall könnten die markierten Zellen von den nicht markierten Zellen getrennt und ihre Entwicklung *in vitro* beobachtet werden.

Schließlich konnte durch die Untersuchung der drei grundlegenden Schritte der Inkulturnahme gezeigt werden, dass die entstehende Zellpopulation durch jeden dieser Parameter beeinflusst wird, der Effekt der Adhäsion an Zellkulturoberflächen und der Anteil des Serums im Medium auf die Zellen jedoch am gravierendsten war.

Die bisherigen Untersuchungen wurden an exokrinen Drüsenzellen der Ratte und der Maus durchgeführt und müssten für andere Organe und andere Spezies verifiziert werden. Jedoch ist anzunehmen, dass sich die erzielten Ergebnisse auf die meisten Zelltypen übertragen lassen. Einen Hinweis darauf liefern die Beschreibungen anderer Autoren, die Zellen beobachteten, die nach der Inkulturnahme ihre Differenzierung verloren. So wurde unter anderem ein Verlust der Differenzierung für retinale Pigmentepithelzellen, Chondrozyten und pankreatische β -Zellen gezeigt (Holtzer, Abbott et al. 1960; Alge, Suppmann et al. 2003; Russ, Ravassard et al. 2009).

7. Literaturverzeichnis

Alge, C. S., S. Suppmann, et al. (2003). "Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(8): 3629-3641.

Apte, M. V., P. S. Haber, et al. (1998). "Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture." Gut **43**(1): 128-133.

Bachem, M. G., E. Schneider, et al. (1998). "Identification, culture, and characterization of pancreatic stellate cells in rats and humans." Gastroenterology **115**(2): 421-432.

Barnes, D. and G. Sato (1980). "Serum-free cell culture: a unifying approach." Cell **22**(3): 649-655.

Barry, F. P. and J. M. Murphy (2004). "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization." Int J Biochem Cell Biol **36**(4): 568-584.

Berk, A. and D. Baltimore (2000). Molekulare Zellbiologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Birchmeier, C., W. Birchmeier, et al. (1996). "Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression." Acta Anat (Basel) **156**(3): 217-226.

Bockman, D. E. (1993). Anatomy of the Pancreas, Raven Press.

Bonner-Weir, S. and A. Sharma (2002). "Pancreatic stem cells." J Pathol **197**(4): 519-526.

Bonner-Weir, S., E. Toschi, et al. (2004). "The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells." Pediatr Diabetes **5 Suppl 2**: 16-22.

Burgeson, R. E. and M. E. Nimni (1992). "Collagen types. Molecular structure and tissue distribution." Clin Orthop Relat Res(282): 250-272.

Carrasco, M., I. Delgado, et al. (2012). "GATA4 and GATA6 control mouse pancreas organogenesis." J Clin Invest **122**(10): 3504-3515.

Carrel, A. and M. T. Burrows (1911). "Cultivation of Tissues in Vitro and Its Technique." J Exp Med **13**(3): 387-396.

Chen, S. F., Y. C. Chang, et al. (2012). "Nonadhesive culture system as a model of rapid sphere formation with cancer stem cell properties." PLoS One **7**(2): e31864.

Chen, Y., D. J. Abraham, et al. (2004). "CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin." Mol Biol Cell **15**(12): 5635-5646.

Cornelius, J. G., V. Tchernev, et al. (1997). "In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas." Horm Metab Res **29**(6): 271-277.

Desai, B. M., J. Oliver-Krasinski, et al. (2007). "Preexisting pancreatic acinar cells contribute to acinar cell, but not islet beta cell, regeneration." J Clin Invest **117**(4): 971-977.

- Dor, Y., J. Brown, et al. (2004). "Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation." Nature **429**(6987): 41-46.
- Egaña, J. T., S. Danner, et al. (2009). "The use of glandular-derived stem cells to improve vascularization in scaffold-mediated dermal regeneration." Biomaterials **30**(30): 5918-5926.
- Fanjul, M., V. Gmyr, et al. (2010). "Evidence for epithelial-mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells." J Histochem Cytochem **58**(9): 807-823.
- Finch, P. W. and J. S. Rubin (2006). "Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors." J Natl Cancer Inst **98**(12): 812-824.
- Finegood, D. T., L. Scaglia, et al. (1995). "Dynamics of beta-cell mass in the growing rat pancreas. Estimation with a simple mathematical model." Diabetes **44**(3): 249-256.
- Francis, G. L. (2010). "Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications." Cytotechnology **62**(1): 1-16.
- Freshney, R. I. (2010). Culture of Animal Cells., Wiley-Blackwell.
- Gabbert, H., R. Wagner, et al. (1985). "Tumor dedifferentiation: an important step in tumor invasion." Clin Exp Metastasis **3**(4): 257-279.
- Galbraith, D. N. (2002). "Transmissible spongiform encephalopathies and tissue cell culture." Cytotechnology **39**(2): 117-124.
- Gordon, M. K. and B. R. Olsen (1990). "The contribution of collagenous proteins to tissue-specific matrix assemblies." Curr Opin Cell Biol **2**(5): 833-838.
- Gorjup, E., S. Danner, et al. (2009). "Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar stem cell populations." Eur J Cell Biol **88**(7): 409-421.
- Grapin-Botton, A. (2005). "Ductal cells of the pancreas." Int J Biochem Cell Biol **37**(3): 504-510.
- Guan, K., J. Rohwedel, et al. (1999). "Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro." Cytotechnology **30**(1-3): 211-226.
- Hansson, M. G., G. Helgesson, et al. (2007). "Commentary: isolated stem cells--patentable as cultural artifacts?" Stem Cells **25**(6): 1507-1510.
- Harding, H. P., H. Zeng, et al. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk-/- mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." Mol Cell **7**(6): 1153-1163.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, et al. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J **374**(Pt 1): 1-20.
- Holtzer, H., J. Abbott, et al. (1960). "THE LOSS OF PHENOTYPIC TRAITS BY DIFFERENTIATED CELLS IN VITRO, I. DEDIFFERENTIATION OF CARTILAGE CELLS." Proc Natl Acad Sci U S A **46**(12): 1533-1542.

- Ianus, A., G. G. Holz, et al. (2003). "In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion." J Clin Invest **111**(6): 843-850.
- Jackson, K. A., S. M. Majka, et al. (2001). "Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells." J Clin Invest **107**(11): 1395-1402.
- Jaster, R., G. Sparmann, et al. (2002). "Extracellular signal regulated kinases are key mediators of mitogenic signals in rat pancreatic stellate cells." Gut **51**(4): 579-584.
- Johnson, P. T. and R. J. Beeson (1966). "In vitro studies on *Patiria mininata* (Brandt) coelomocytes, with remarks on revolving cysts." Life Sci **5**(18): 1641-1666.
- Kassis, I., L. Zangi, et al. (2006). "Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads." Bone Marrow Transplant **37**(10): 967-976.
- Keenan, J., D. Pearson, et al. (2006). "The role of recombinant proteins in the development of serum-free media." Cytotechnology **50**(1-3): 49-56.
- Keller, G. M. (1995). "In vitro differentiation of embryonic stem cells." Curr Opin Cell Biol **7**(6): 862-869.
- Klein, P. A., J. H. Xiang, et al. (1984). "Melanoma cells growing in aggregates on a non-adhesive poly(HEMA) substrate exhibit polykaryocytosis but do not develop an increased metastatic capability." Clin Exp Metastasis **2**(4): 287-295.
- Kruse, C., M. Birth, et al. (2004). "Pluripotency of adult stem cells derived from human and rat pancreas." Applied Physics a-Materials Science & Processing **79**(7): 1617-1624.
- Kruse, C., J. Kajahn, et al. (2006). "Adult pancreatic stem/progenitor cells spontaneously differentiate in vitro into multiple cell lineages and form teratoma-like structures." Ann Anat **188**(6): 503-517.
- Kruse, M. L., P. B. Hildebrand, et al. (2001). "Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells." Pancreas **23**(1): 49-54.
- Lambert, E., E. Dasse, et al. (2004). "TIMPs as multifacial proteins." Crit Rev Oncol Hematol **49**(3): 187-198.
- Lin, H.-T., S.-H. Chiou, et al. (2006). "Characterization of pancreatic stem cells derived from adult human pancreas ducts by fluorescence activated cell sorting." World J Gastroenterol **12**(28): 4529-4535.
- Lin, W., Y. W. Huang, et al. (2006). "In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells." Toxicol Appl Pharmacol **217**(3): 252-259.
- Magnuson, M. A. and A. B. Osipovich (2013). "Pancreas-specific Cre driver lines and considerations for their prudent use." Cell Metab **18**(1): 9-20.
- McKenzie, S. L. and M. Meselson (1977). "Translation in vitro of *Drosophila* heat-shock messages." J Mol Biol **117**(1): 279-283.

- Merten, O. W. (2006). "Introduction to animal cell culture technology-past, present and future." Cytotechnology **50**(1-3): 1-7.
- Mirsky, R., A. Woodhoo, et al. (2008). "Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation." J Peripher Nerv Syst **13**(2): 122-135.
- Moll, R., W. W. Franke, et al. (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**(1): 11-24.
- Moujalled, D. M., W. D. Cook, et al. (2013). "TNF can activate RIPK3 and cause programmed necrosis in the absence of RIPK1." Cell Death Dis **4**: e465.
- Natarajan, S., S. Hombach-Klonisch, et al. (2013). "HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells." Neoplasia **15**(3): 263-280.
- Nussey, S. and s. Whitehead (2001). The endocrine pancreas. Oxford, BIOS Scientific Publishers.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Ramiya, V. K., M. Maraist, et al. (2000). "Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells." Nat Med **6**(3): 278-282.
- Rapoport, D. H., S. Danner, et al. (2009). "Glandular stem cells are a promising source for much more than beta-cell replacement." Ann Anat **191**(1): 62-69.
- Rapoport, D. H., S. Schicktzanz, et al. (2009). "Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells." Ann Anat **191**(5): 446-458.
- Rawlings, N. D. and G. Salvesen (2013). Clostridium Collagenases., Academic Press.
- Rawlings, N. D. and G. Salvesen (2013). Clostripain., Academic Press.
- Rawlings, N. D. and G. Salvesen (2013). Trypsin., Academic Press.
- Robey, P. G., M. F. Young, et al. (1987). "Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro." J Cell Biol **105**(1): 457-463.
- Rosner, M. H., M. A. Vigano, et al. (1990). "A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo." Nature **345**(6277): 686-692.
- Russ, H. A., P. Ravassard, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transition in cells expanded in vitro from lineage-traced adult human pancreatic beta cells." PLoS One **4**(7): e6417-e6417.
- Salem, H., P. Ciba, et al. (2009). "The influence of pancreas-derived stem cells on scaffold based skin regeneration." Biomaterials **30**(5): 789-796.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-5170.

- Schibler, U., M. Tosi, et al. (1980). "Tissue-specific expression of mouse alpha-amylase genes." J Mol Biol **142**(1): 93-116.
- Schmitz, S. (2009). Der Experimentator Zellkultur. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Schulz, T. J., M. Glaubitz, et al. (2007). "Variable expression of Cre recombinase transgenes precludes reliable prediction of tissue-specific gene disruption by tail-biopsy genotyping." PLoS One **2**(10): e1013.
- Schussler, M. H., A. Skoudy, et al. (1992). "Intermediate filaments as differentiation markers of normal pancreas and pancreas cancer." Am J Pathol **140**(3): 559-568.
- Seaberg, R. M., S. R. Smukler, et al. (2004). "Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages." Nat Biotechnol **22**(9): 1115-1124.
- Seeberger, K. L., J. M. Dufour, et al. (2006). "Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium." Lab Invest **86**(2): 141-153.
- Seong, S. H. and R. Ashley (1974). Cell Biology, New Age International Publishers.
- Shuttleworth, C. A. (1997). "Type VIII collagen." Int J Biochem Cell Biol **29**(10): 1145-1148.
- Skalli, O., P. Ropraz, et al. (1986). "A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation." J Cell Biol **103**(6 Pt 2): 2787-2796.
- Sotomayor, M. and K. Schulten (2008). "The allosteric role of the Ca²⁺ switch in adhesion and elasticity of C-cadherin." Biophys J **94**(12): 4621-4633.
- Sternberg, N. and D. Hamilton (1981). "Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites." J Mol Biol **150**(4): 467-486.
- Steward, A. J., Y. Liu, et al. (2011). "Engineering Cell Attachments to Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering." Biomaterials **63**.
- Stuart, R. A., D. Mackay, et al. (1993). "Inhibition of intra-Golgi transport in vitro by mitotic kinase." J Biol Chem **268**(6): 4050-4054.
- Suzuki, R., T. Furuno, et al. (1999). "Direct neurite-mast cell communication in vitro occurs via the neuropeptide substance P." J Immunol **163**(5): 2410-2415.
- Sziegoleit, A., D. Linder, et al. (1985). "Studies on the specificity of the cholesterol-binding pancreatic proteinase and identification as human pancreatic elastase 1." Eur J Biochem **151**(3): 595-599.
- Szmola, R., Z. Kukor, et al. (2003). "Human mesotrypsin is a unique digestive protease specialized for the degradation of trypsin inhibitors." J Biol Chem **278**(49): 48580-48589.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." Cell **126**(4): 663-676.

- Takeichi, M. (1977). "Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins." J Cell Biol **75**(2 Pt 1): 464-474.
- Talchai, C., S. Xuan, et al. (2012). "Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure." Cell **150**(6): 1223-1234.
- Thiery, J. P., H. Acloque, et al. (2009). "Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease." Cell **139**(5): 871-890.
- Tibbitt, M. W. and K. S. Anseth (2009). "Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture." Biotechnol Bioeng **103**(4): 655-663.
- Toledo, F. and G. M. Wahl (2006). "Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas." Nat Rev Cancer **6**(12): 909-923.
- Urruticoechea, A., I. E. Smith, et al. (2005). "Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer." J Clin Oncol **23**(28): 7212-7220.
- Vaughan, M. (1987). The metabolism of adipose tissue *in vitro*, J. Lipid Res.
- Wagner, K. U., K. McAllister, et al. (2001). "Spatial and temporal expression of the Cre gene under the control of the MMTV-LTR in different lines of transgenic mice." Transgenic Res **10**(6): 545-553.
- Weir, G. C., C. Aguayo-Mazzucato, et al. (2013). "beta-cell dedifferentiation in diabetes is important, but what is it?" Islets **5**(5): 233-237.
- Wiese, C., A. Rolletschek, et al. (2004). "Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells?" Cell Mol Life Sci **61**(19-20): 2510-2522.
- Willis, B. C. and Z. Borok (2007). "TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(3): L525-534.
- Wollert, K. C., G. P. Meyer, et al. (2004). "Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial." Lancet **364**(9429): 141-148.
- Xu, L., R. B. Corcoran, et al. (2000). "WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene." Genes Dev **14**(5): 585-595.
- Yee, N. S., S. Yusuff, et al. (2001). "Zebrafish *pdx1* morphant displays defects in pancreas development and digestive organ chirality, and potentially identifies a multipotent pancreas progenitor cell." Genesis **30**(3): 137-140.
- Young, M. R. and N. H. Colburn (2006). "Fra-1 a target for cancer prevention or intervention." Gene **379**: 1-11.
- Yu, S., S. A. Michie, et al. (2004). "Absence of the major zymogen granule membrane protein, GP2, does not affect pancreatic morphology or secretion." J Biol Chem **279**(48): 50274-50279.
- Yuan, A., M. V. Rao, et al. (2012). "Neurofilaments at a glance." J Cell Sci **125**(Pt 14): 3257-3263.

7. Literaturverzeichnis

Zeng, Q. and W. Hong (2008). "The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals." Cancer Cell **13**(3): 188-192.

Zulewski, H., E. J. Abraham, et al. (2001). "Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes." Diabetes **50**(3): 521-533.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Inkulturnahme exokriner pankreatischer Acini.	4
Abbildung 2: Kultivierung und Propagation adhärent wachsender Zellen.	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Cre/LoxP-Reportersystems.	25
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Programms der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion.....	36
Abbildung 5: Enzymatische Spaltung von X-Gal.	40
Abbildung 6: Globale Genexpressionsanalyse.	44
Abbildung 7: Änderung der Genexpression muriner Pankreaszellen.	45
Abbildung 8: Differenzielle Expression von Genen in Passage 0, die die pankreatische Identität (A) und Funktionalität (B) bestimmen.	46
Abbildung 9: <i>GoMiner</i> -Kategorien biologischer Prozesse.	47
Abbildung 10: Vergleich der relativen Expression pankreasspezifischer Gene im Gewebe (n=2) und wenige Stunden nach der Inkulturnahme.....	49
Abbildung 11: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene im Gewebe (n=2) und wenige Stunden nach der Inkulturnahme.....	50
Abbildung 12: <i>Time-lapse</i> exokriner muriner Pankreaszellen.....	52
Abbildung 13: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene im Gewebe und in den Passagen 0 bis 5.....	53
Abbildung 14: Abbildungsunterschrift: s S.57	55
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von Zellen direkt nach der Isolation (T0) und in der Passage 5.....	56
Abbildung 16: X-Gal-Färbung an murinen Pankreaszellen.....	58
Abbildung 17: β -Galactosidase-Expression exokriner Pankreaszellen.....	59
Abbildung 18: Anteil an β -Galactosidase synthetisierenden Zellen an der Gesamtpopulation.	59
Abbildung 19: Mit und ohne Kollagenase isolierte Zellen direkt nach der Präparation.	61
Abbildung 20: Effekt des enzymatischen Verdaus während der Isolation auf die Zellausbeute.	61
Abbildung 21: Zellen vier Tage nach der Propagation mit und ohne Trypsin.	62
Abbildung 22: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit bzw. ohne Trypsin propagiert wurden.	63
Abbildung 23: Morphologie von Zellen mit unterschiedlichen Serumanteilen nach einer Woche in Kultur.....	64
Abbildung 24: Untersuchung der DNA-Neusynthese von Zellen, die mit unterschiedlichem Serumgehalt kultiviert wurden.	64
Abbildung 25: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit 1 %, 5 % oder 10 % Serum kultiviert wurden.....	65
Abbildung 26: Wachstum von Speicheldrüsenzellen mit unterschiedlichem Serumanteil im Kulturmedium.....	66
Abbildung 27: Adhärente und nicht adhärente Kultivierung exokriner Speicheldrüsenzellen.....	67
Abbildung 28: Zellaggregate in Suspensionskultur.	68

Abbildung 29: Wachstum von adhären wachsenden und Suspensionskultur-Zellen..... 68
Abbildung 30: Stoffwechselaktivität von adhären wachsenden Zellen und Zellen in
Suspensionskultur. 69

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wirkung unterschiedlicher Faktoren auf die Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen.. 78

8.3 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	<i>α smooth muscle actin</i>
CAM	<i>cell adhesion molecule</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CJM	<i>cell junction molecule</i>
Col8a1	Kollagen Typ VIII, α
Col12a1	Kollagen Typ XII, α
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
Cre	<i>“causing recombination”</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribunukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
FGF7	<i>fibroblast growth factor 7</i>

FKS	Fetales Kälberserum
FOSL1	<i>FOS-like antigene 1</i>
gDNA	genomische DNA
GP2	Glykoprotein 2
HMGA2	<i>High-mobility group AT-hook 2</i>
IgSF	Immunglobulin Superfamilie
IL-6	Interleukin 6
KLF4	<i>Krüppel-like factor 4</i>
LoxP	<i>“locus of crossing over (x)”</i>
Oct-4	<i>octamer-binding transcription factor 4</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDX1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	quantitative Realtime-PCR
RIPK3	<i>Receptor interacting serin-threonin kinase 3</i>
SAM	<i>substrate adhesion molecule</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute

8.4 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Weder vorher noch gleichzeitig habe ich andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Lübeck, den 28.08.2014

8.5 Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Dr. Charli Kruse für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit auf diesem spannenden Gebiet und in diesem tollen Team durchführen zu dürfen. Vielen Dank für die Unterstützung und die wertvollen Anregungen und Gespräche.

Dr. Daniel Rapoport möchte ich ganz herzlich für die tolle Betreuung meiner Doktorarbeit, die großartige Unterstützung und die anregenden Gespräche danken.

Ich danke Dr. Andrej-Nikolai Spiess aus der Abteilung für Andrologie der Klinik für Dermatologie des Universitäts-Klinikums Hamburg Eppendorf für die Normalisierung der *Microarray*-Daten und die Durchführung der Hauptkomponentenanalyse und des hierarchischen Clusterings.

Ich möchte der gesamten EMB für die gute Zusammenarbeit, das tolle Arbeitsklima und den TAs für ihre großartige Unterstützung danken.

Ein besonders großer Dank geht an die Techies, für die schöne gemeinsame Zeit, die aufbauenden Gespräche und Motivationsschübe und den guten Zusammenhalt.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die stets für mich da waren und mich unterstützt haben. Und Stefan, der immer an mich geglaubt und mich mit viel Liebe und Geduld in dieser aufregenden Zeit begleitet hat.

Abbildungsverzeichnis Anhang:

Abbildung 1: Intensitätsverteilung der Proben in der globalen Genexpressionsanalyse vor und nach der Normalisierung der Daten.....	3
Abbildung 2: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR und im Microarray.....	4
Abbildung 3: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR und im Microarray.....	5
Abbildung 4: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR und im Microarray.....	5
Abbildung 5: Kapillargelelektrophorese für das Gen GP2 über den gesamten Kultivierungszeitraum. .	7
Abbildung 6: Kapillargelelektrophorese für das Gen GATA4 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	7
Abbildung 7: Kapillargelelektrophorese für das Gen Amy1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	8
Abbildung 8: Kapillargelelektrophorese für das Gen Try4 über den gesamten Kultivierungszeitraum..	8
Abbildung 9: Kapillargelelektrophorese für das Gen α -SMA über den gesamten Kultivierungszeitraum.	8
Abbildung 10: Kapillargelelektrophorese für das Gen HMGA2 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	9
Abbildung 11: Kapillargelelektrophorese für das Gen FOSL1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	9
Abbildung 12: Kapillargelelektrophorese für das Gen IL-6 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	9
Abbildung 13: Kapillargelelektrophorese für das Gen RIPK3 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	10
Abbildung 14: Kapillargelelektrophorese für das Gen CTGF über den gesamten Kultivierungszeitraum.	10
Abbildung 15: Kapillargelelektrophorese für das Gen WISP1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	10
Abbildung 16: Kapillargelelektrophorese für das Gen TIMP1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	11
Abbildung 17: Kapillargelelektrophorese für das Gen Col8a1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	11
Abbildung 18: Kapillargelelektrophorese für das Gen Col12a1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	11
Abbildung 19: Kapillargelelektrophorese für das Gen FGF7 über den gesamten Kultivierungszeitraum.	12
Abbildung 20: Analyse der Proteinexpression von Zellen im Gewebe und in den Passagen 0 und 5 mittels Immunfluoreszenzfärbung.	16
Abbildung 21: Analyse der Proteinexpression von Zellen im Gewebe und in der Passagen 5 mittels Immunfluoreszenzfärbung.	17
Abbildung 22: Mit bzw. ohne Kollagenase isolierte Speicheldrüsenzellen.....	19
Abbildung 23: Wachstum von exokrinen Zellen, die mit bzw. ohne Kollagenase isoliert wurden.	19
Abbildung 24: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit bzw. ohne Kollagenase isoliert wurden.	20
Abbildung 25: Wachstum von exokrinen Zellen, die mit bzw. ohne Trypsin propagiert wurden.....	20

Abbildung 26: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit 5 % oder 10 % Serum kultiviert wurden.....	21
--	----

Tabellenverzeichnis Anhang:

Tabelle 1: Vergleich der relativen Expression von Genen der Pankreasidentität in der globalen Genexpressionsanalyse: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3.	3
Tabelle 2: Vergleich der relativen Expression von Genen der Pankreasfunktion in der globalen Genexpressionsanalyse: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3.	4
Tabelle 3: Relative Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR aus dem murinen Pankreasgewebe und kultivierten Zellen der Passagen 0, 1, 5 und 10.	6
Tabelle 4: Relative Expression unterschiedlicher Gene in der globalen Genexpressionsanalyse aus dem murinen Pankreasgewebe und kultivierten Zellen der Passagen 0, 1, 5 und 10.	6
Tabelle 5: Quantitative Real-time PCR über die ersten drei Tage nach Inkulturnahme.	7
Tabelle 6: Relative Expression muriner exokriner Pankreaszellen.....	12
Tabelle 7: Analyse der Proteinexpression muriner Pankreaszellen mittels Fluoreszenzfärbung. Anzahl der positiven Zellen in Prozent.....	17
Tabelle 8: Analyse der Proteinexpression muriner Pankreaszellen mittels Fluoreszenzfärbung. Anzahl der positiven Zellen in Prozent.....	18
Tabelle 9: Anteil an β -Galactosidase exprimierenden Zellen in Prozent.	18

Globale Genexpressionsanalyse:

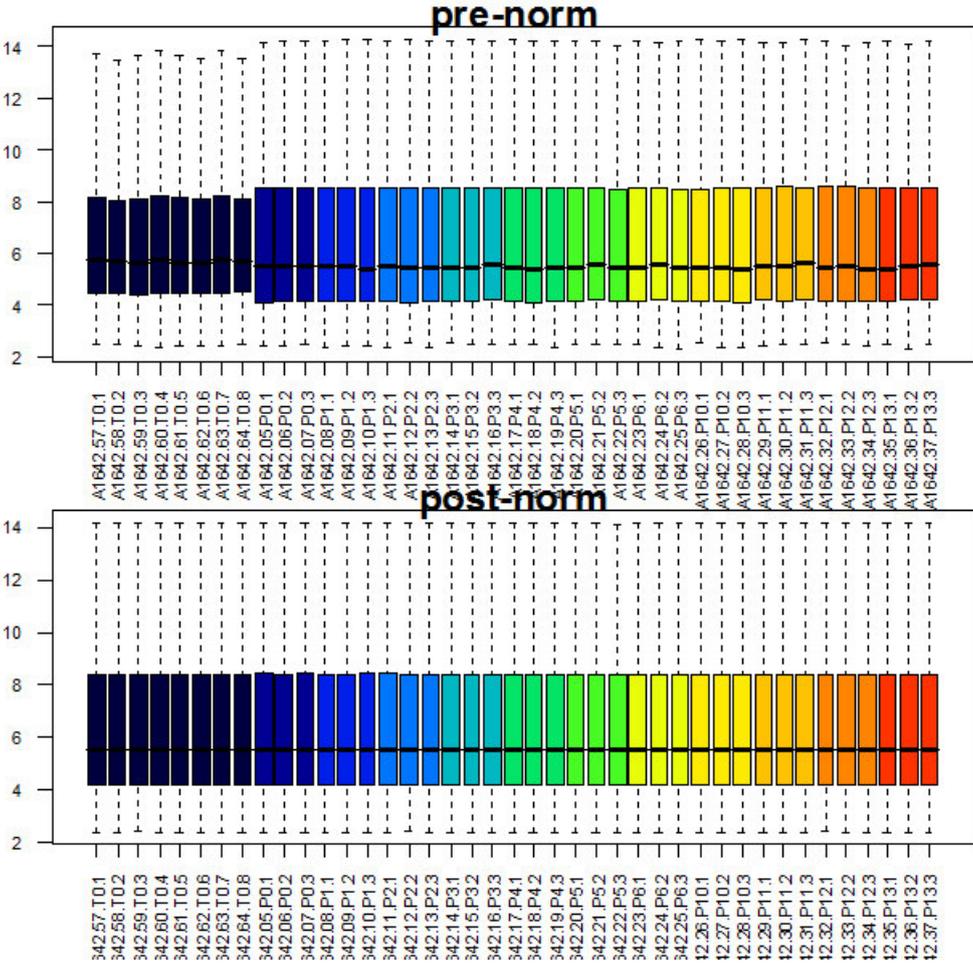


Abbildung 1: Intensitätsverteilung der Proben in der globalen Genexpressionsanalyse vor und nach der Normalisierung der Daten. Die Proben wurden durch die Normalisierung in ihrer Intensitätsverteilung aneinander angeglichen.

Tabelle 1: Vergleich der relativen Expression von Genen der Pankreasidentität in der globalen Genexpressionsanalyse: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3.

	Gewebe	P0
GP2	1	0,001
Rbpjl	1	0,014
Ptf1a	1	0,019
Gata4	1	0,04
Pdx1	1	0,095
Prox1	1	0,098
Foxa2	1	0,134

Tabelle 2: Vergleich der relativen Expression von Genen der Pankreasfunktion in der globalen Genexpressionsanalyse: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3.

	Gewebe	P0
Cpb1	1	0,0011
Cpa3	1	0,14
Cel	1	0,0013
Pnliprp1	1	0,0013
Pnliprp2	1	0,0017
Pnlip	1	0,0018
Ctrc	1	0,0023
Cckar	1	0,0024
Prss2	1	0,0024
Prss3	1	0,152
Pla2g1b	1	0,0036
Amy1	1	0,0036
Try4	1	0,0054
Grpr	1	0,0334

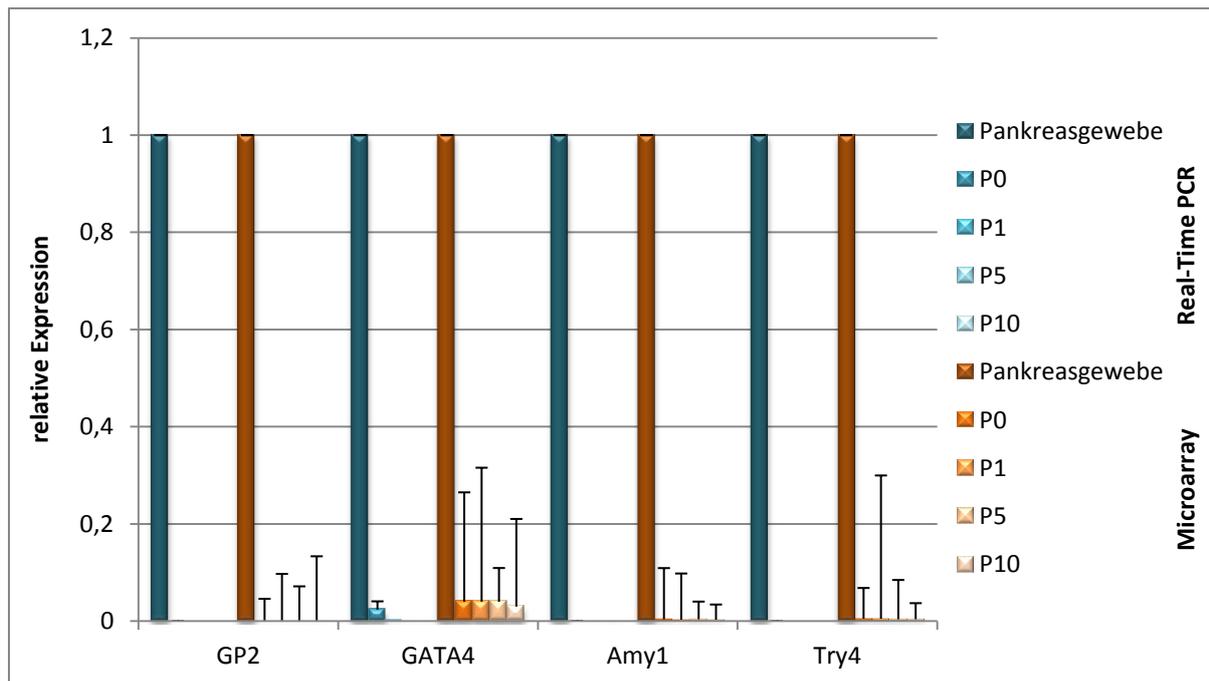


Abbildung 2: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR und im Microarray. qPCR: Gewebe: n=2, P0-P10: n=3; Microarray: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3. SEM.

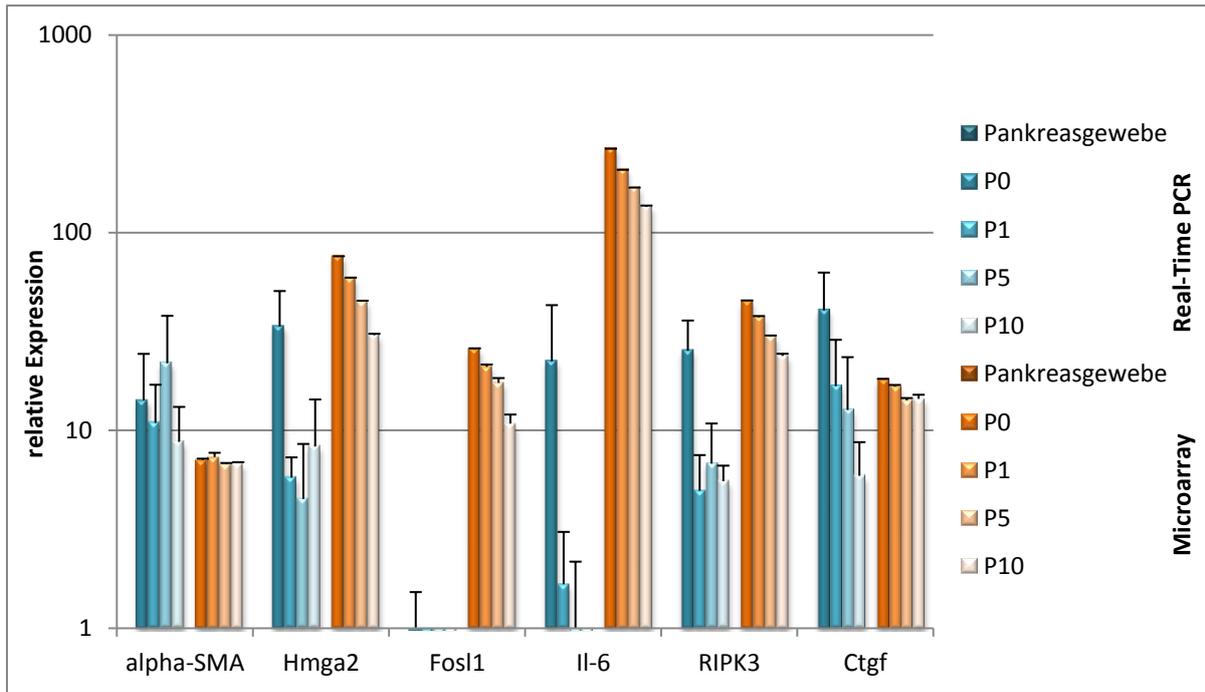


Abbildung 3: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR und im Microarray. qPCR: Gewebe: n=2, P0-P10: n=3; Microarray: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3. SEM.

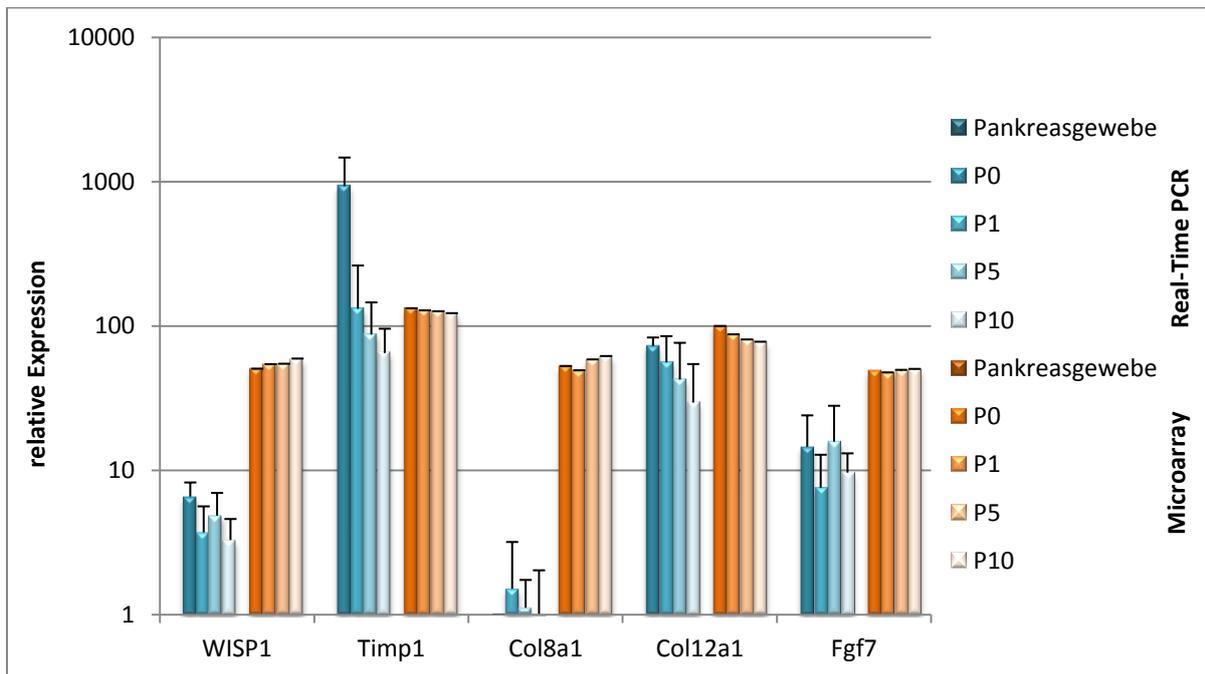


Abbildung 4: Vergleich der relativen Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR und im Microarray. qPCR: Gewebe: n=2, P0-P10: n=3; Microarray: Pankreasgewebe: n=8, P0-P10: n=3. SEM.

Tabelle 3: Relative Expression unterschiedlicher Gene in der quantitativen PCR aus dem murinen Pankreasgewebe und kultivierten Zellen der Passagen 0, 1, 5 und 10.

	Gewebe	P0	P1	P5	P10
α-SMA	1	14,21	10,93	21,88	8,76
HMGA2	1	33,54	5,79	4,51	8,31
FOSL1	0	0,97	0,24	0,21	0,44
IL-6	0	22,11	1,67	0,92	0,25
RIPK3	1	25,37	4,96	6,81	5,55
CTGF	1	40,50	16,76	12,70	5,90
WISP1	0	6,55	3,71	4,84	3,28
TIMP1	1	929,09	131,35	87,02	64,77
Col8a1	0	1,00	1,51	1,11	0,98
Col12a1	1	72,52	55,88	42,49	29,39
FGF7	1	14,49	7,56	15,76	9,62
GP2	1	2,54 x 10 ⁻⁶	0	0	0
GATA4	1	0,02	0,002	0,0001	0,0005
Amy1	1	2,43 x 10 ⁻⁶	2,32 x 10 ⁻⁷	3,08 x 10 ⁻⁷	2,08 x 10 ⁻⁷
Try4	1	3,99 x 10 ⁻⁶	0	0	0

Tabelle 4: Relative Expression unterschiedlicher Gene in der globalen Genexpressionsanalyse aus dem murinen Pankreasgewebe und kultivierten Zellen der Passagen 0, 1, 5 und 10.

	Gewebe	P0	P1	P5	P10
α-SMA	1	7,12	7,35	6,77	6,84
HMGA2	1	76,02	58,90	44,86	30,41
FOSL1	1	25,88	21,03	17,43	10,85
IL-6	1	266,08	207,86	168,91	136,13
RIPK3	1	45,35	37,53	29,91	23,87
CTGF	1	18,13	16,74	14,22	14,48
WISP1	1	50,38	54,04	54,30	58,85
TIMP1	1	132,29	127,89	125,94	121,74
Col8a1	1	52,41	48,65	58,11	61,10
Col12a1	1	99,26	87,09	80,23	77,11
FGF7	1	48,81	47,21	48,95	49,99
GP2	1	0,001	0,001	0,001	0,001
GATA4	1	0,04	0,04	0,04	0,03
Amy1	1	0,004	0,003	0,004	0,003
Try4	1	0,005	0,005	0,004	0,004

Tabelle 5: Quantitative Real-time PCR über die ersten drei Tage nach Inkulturnahme.

	Gewebe	24 Stunden	48 Stunden	72 Stunden
α-SMA	1	0,04	0,74	1,69
HMGA2	1	22,68	32,36	39,35
FOSL1	0	1,00	1,79	0,93
IL-6	0	1,00	0,32	0,33
RIPK3	1	6,02	5,60	6,06
CTGF	1	2,11	5,13	9,39
WISP1	0	0,00	1,00	2,34
TIMP1	1	11,53	67,97	141,74
Col8a1	0	0,00	0,00	0,00
Col12a1	1	1,27	5,94	9,58
FGF7	1	0,57	2,63	2,26
GP2	1	0,13	0,03	0,00286
GATA4	1	0,20	0,18	0,36
Amy1	1	0,04	0,02	0,00051
Try4	1	0,13	0,05	0,00369

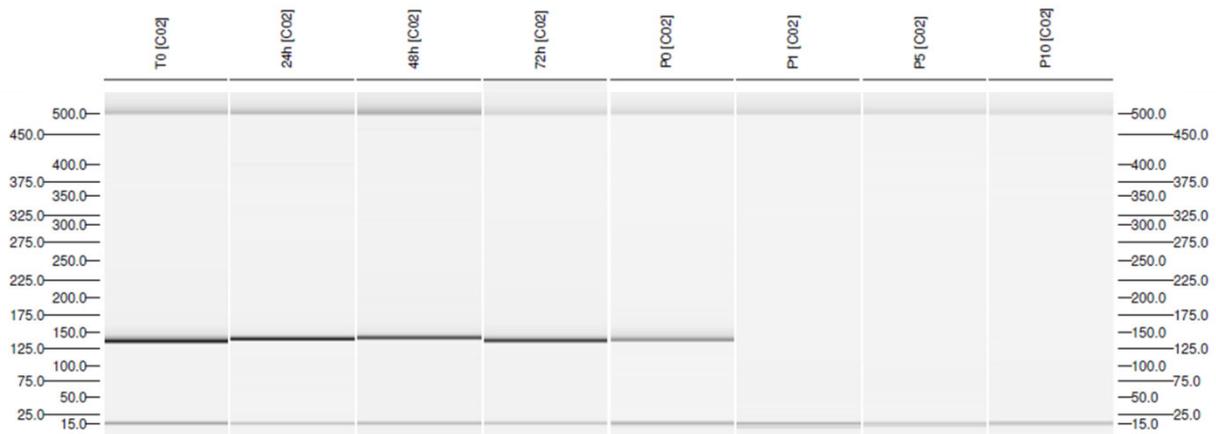


Abbildung 5: Kapillargelelektrophorese für das Gen GP2 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

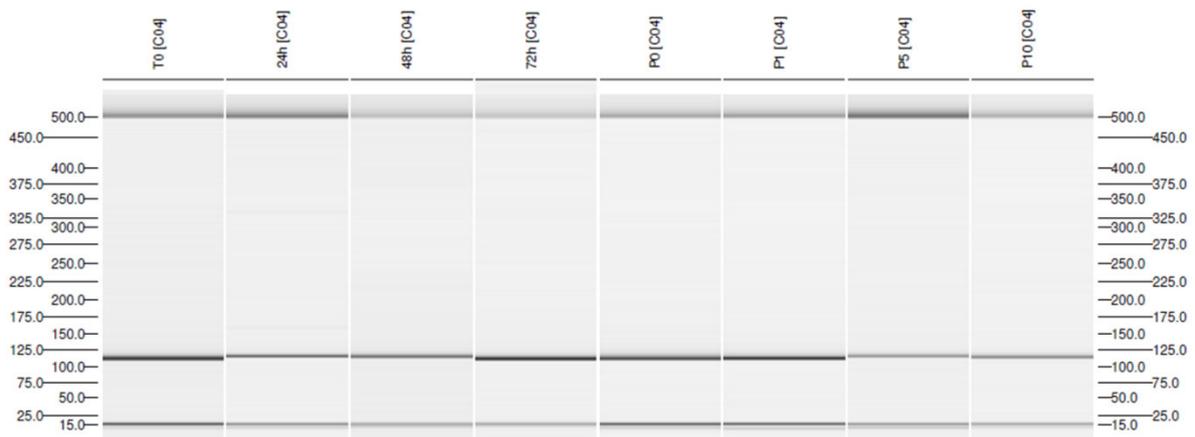


Abbildung 6: Kapillargelelektrophorese für das Gen GATA4 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

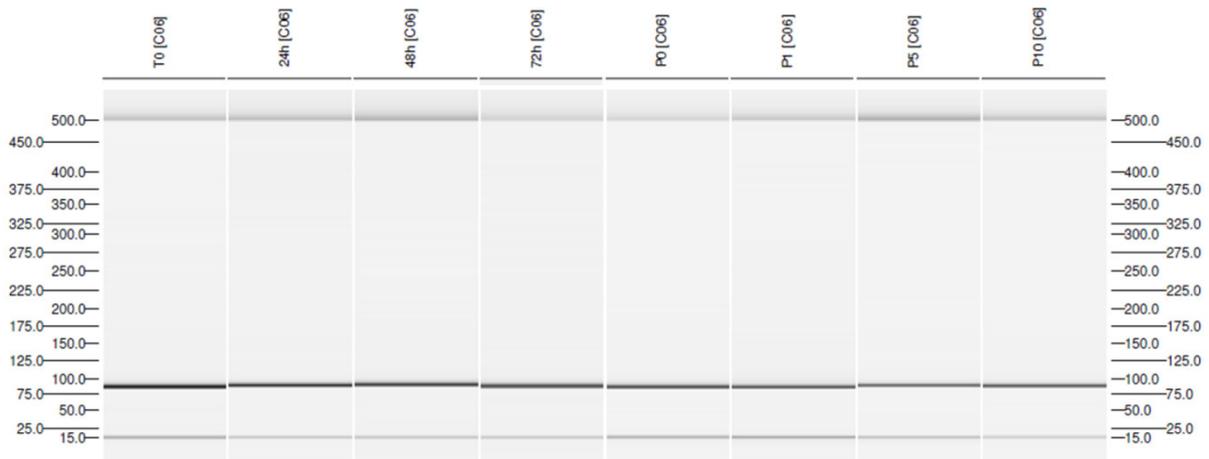


Abbildung 7: Kapillargelelektrophorese für das Gen Amy1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

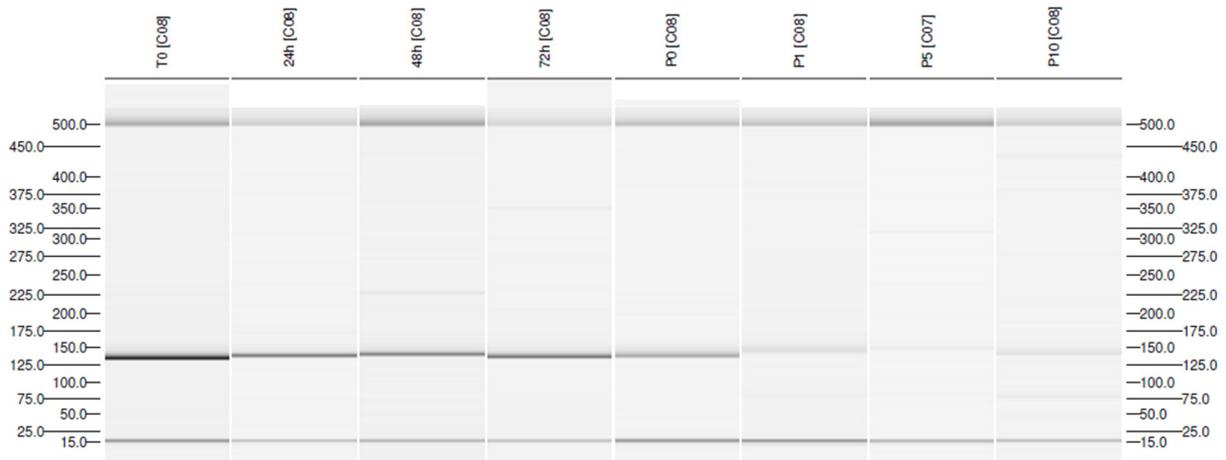


Abbildung 8: Kapillargelelektrophorese für das Gen Try4 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

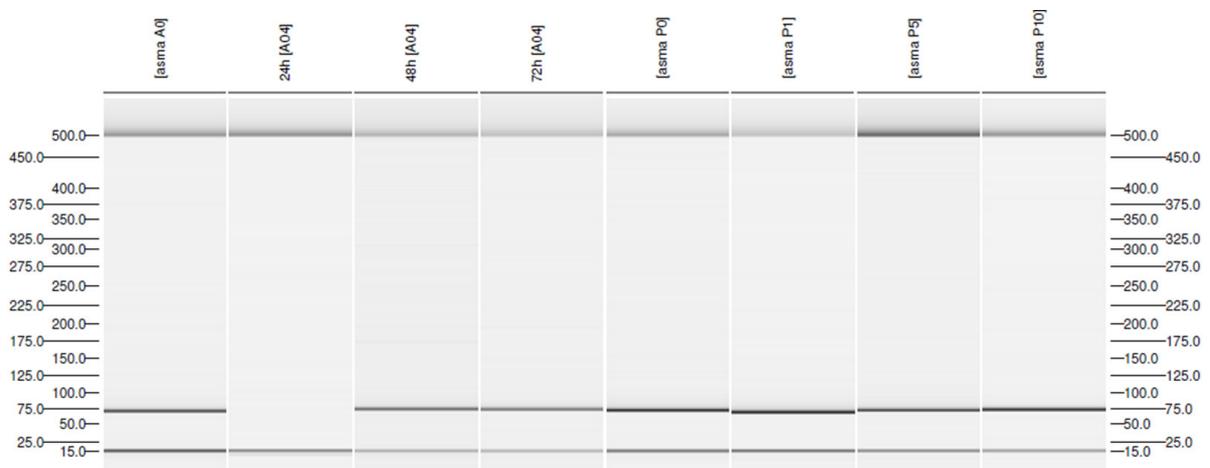


Abbildung 9: Kapillargelelektrophorese für das Gen α -SMA über den gesamten Kultivierungszeitraum.

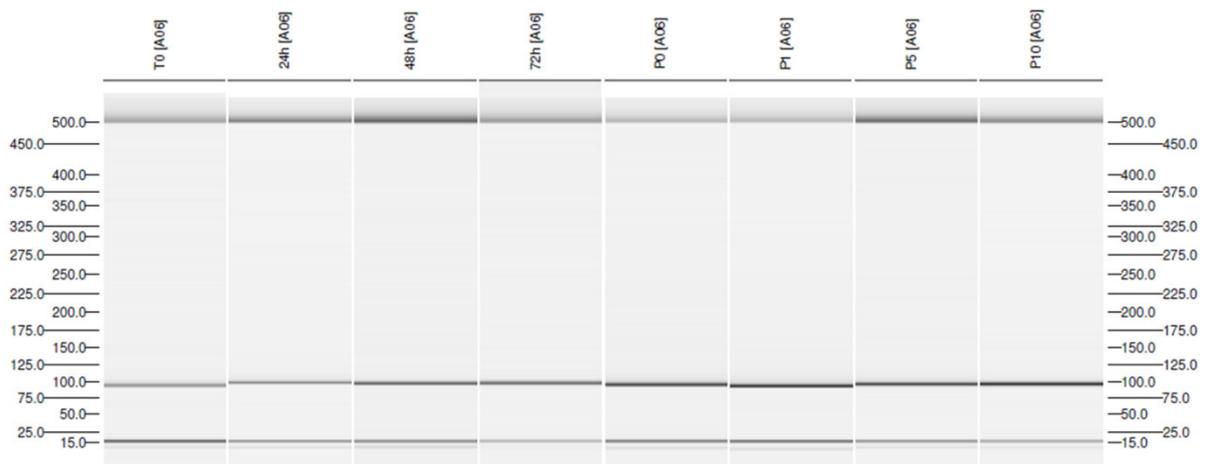


Abbildung 10: Kapillargelelektrophorese für das Gen HMGA2 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

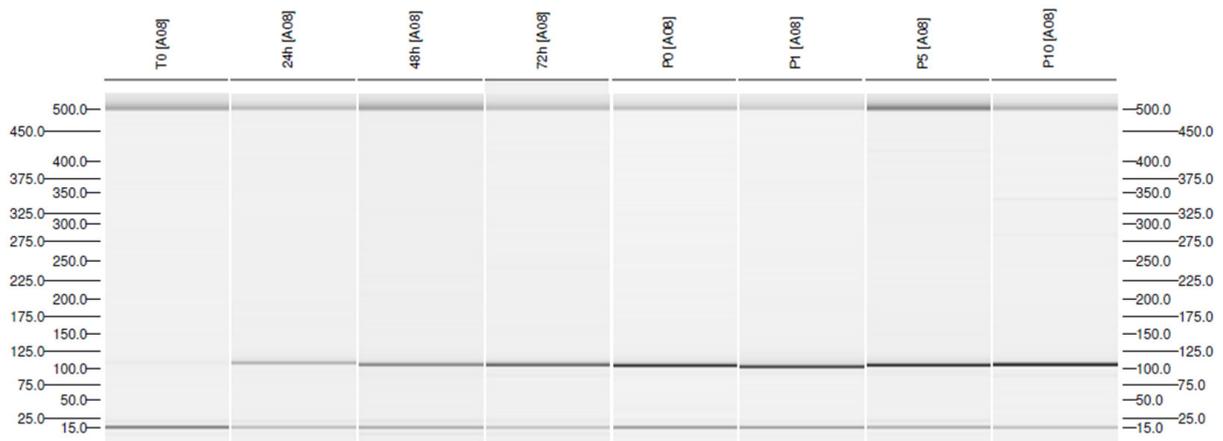


Abbildung 11: Kapillargelelektrophorese für das Gen FOSL1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

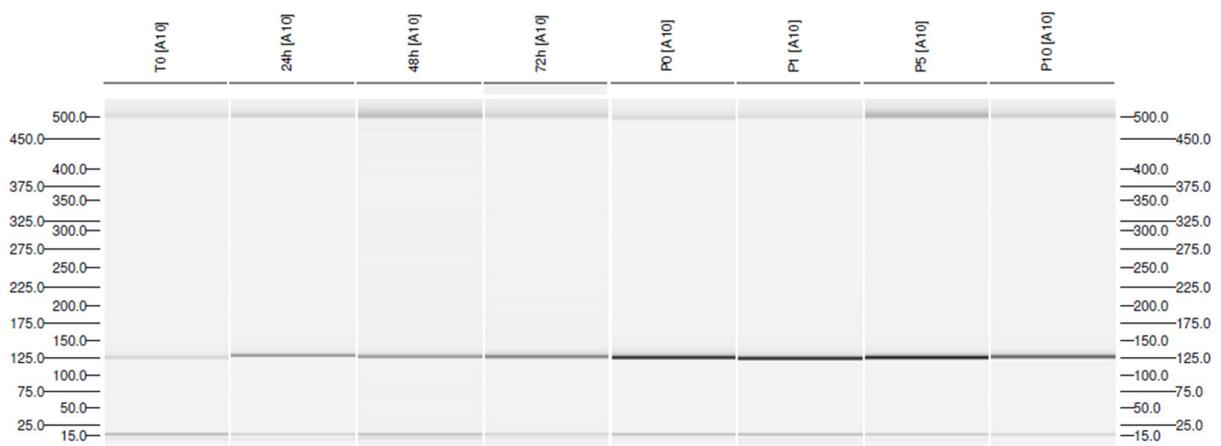


Abbildung 12: Kapillargelelektrophorese für das Gen IL-6 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

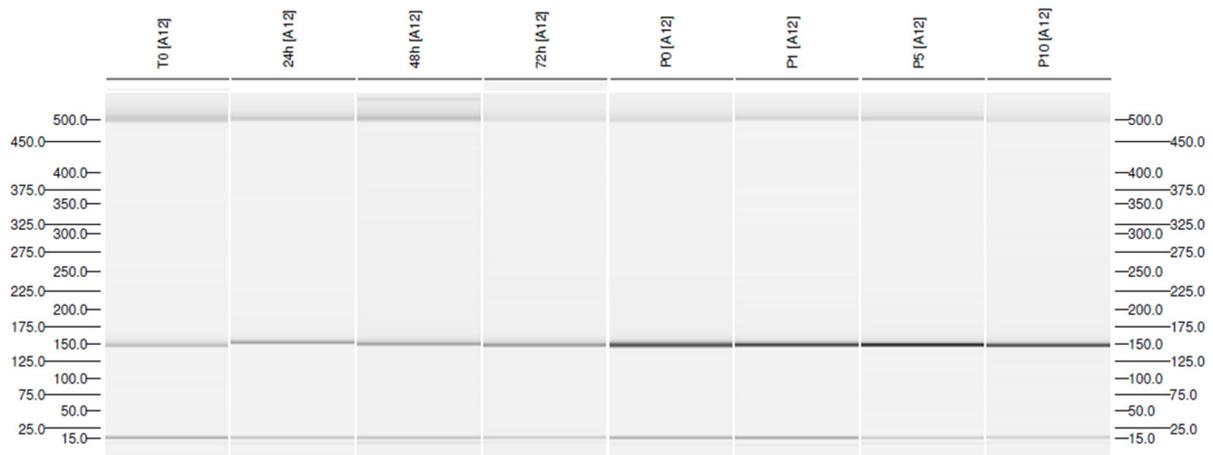


Abbildung 13: Kapillargelelektrophorese für das Gen RIPK3 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

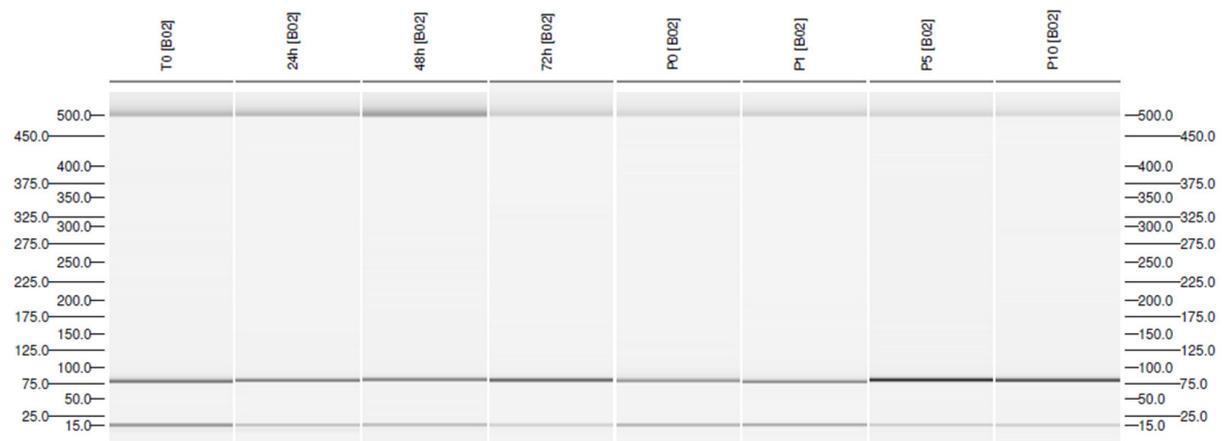


Abbildung 14: Kapillargelelektrophorese für das Gen CTGF über den gesamten Kultivierungszeitraum.

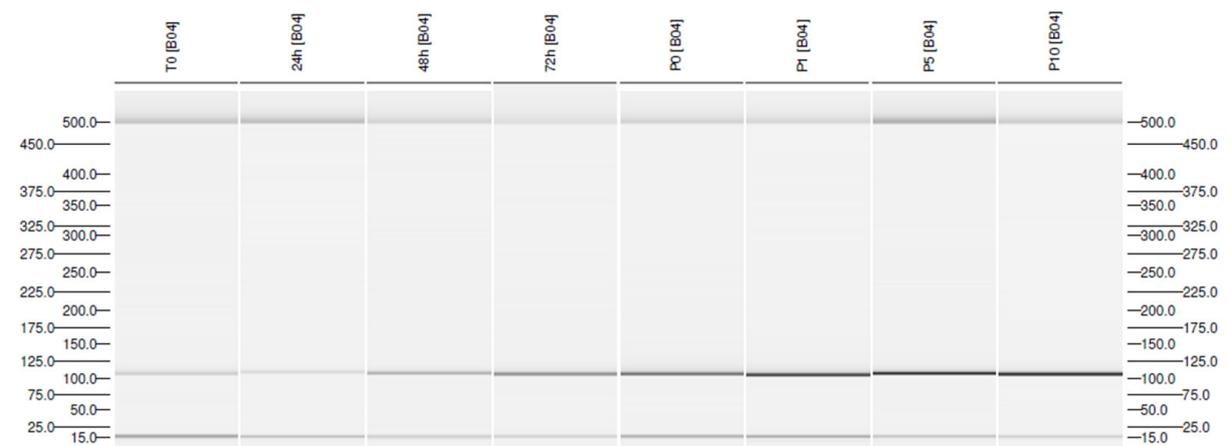


Abbildung 15: Kapillargelelektrophorese für das Gen WISP1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

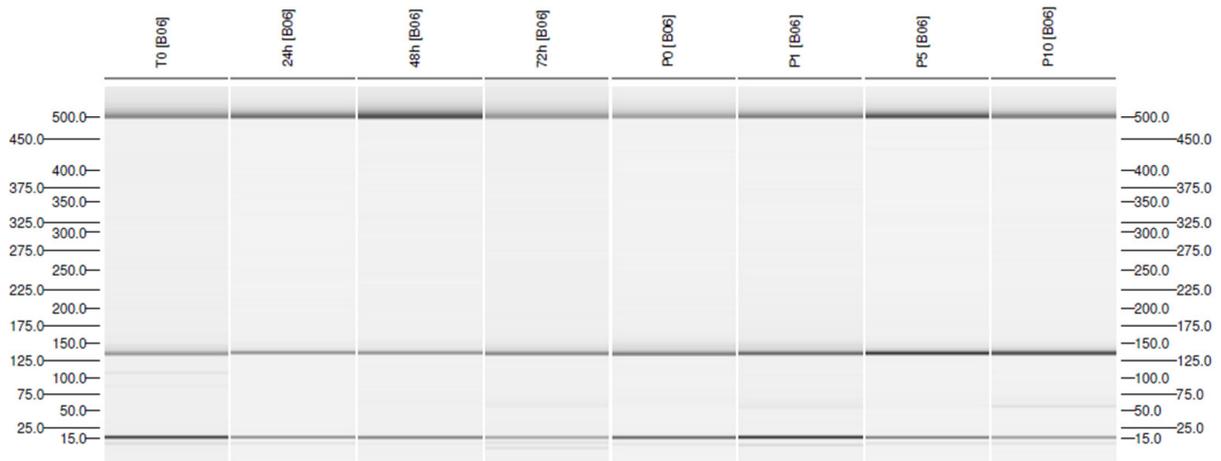


Abbildung 16: Kapillargelelektrophorese für das Gen TIMP1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

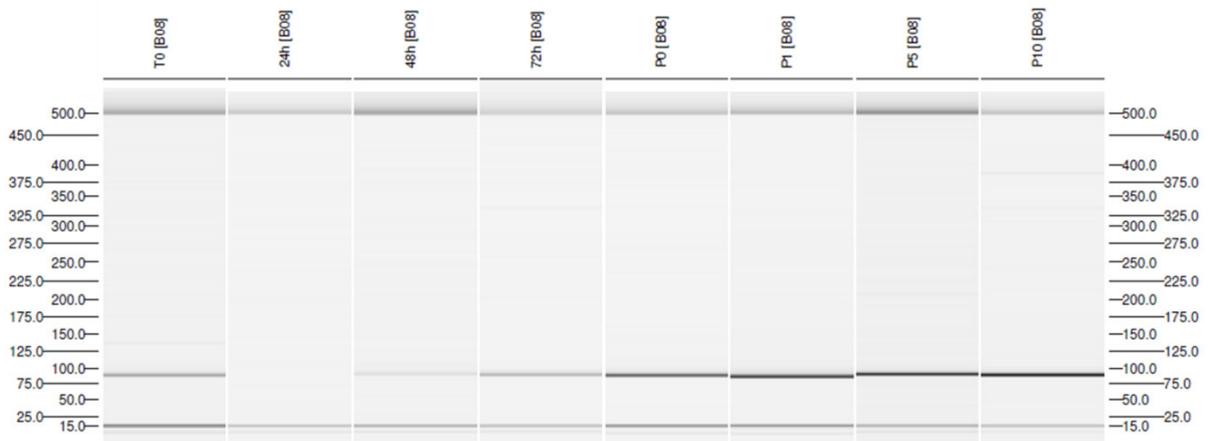


Abbildung 17: Kapillargelelektrophorese für das Gen Col8a1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

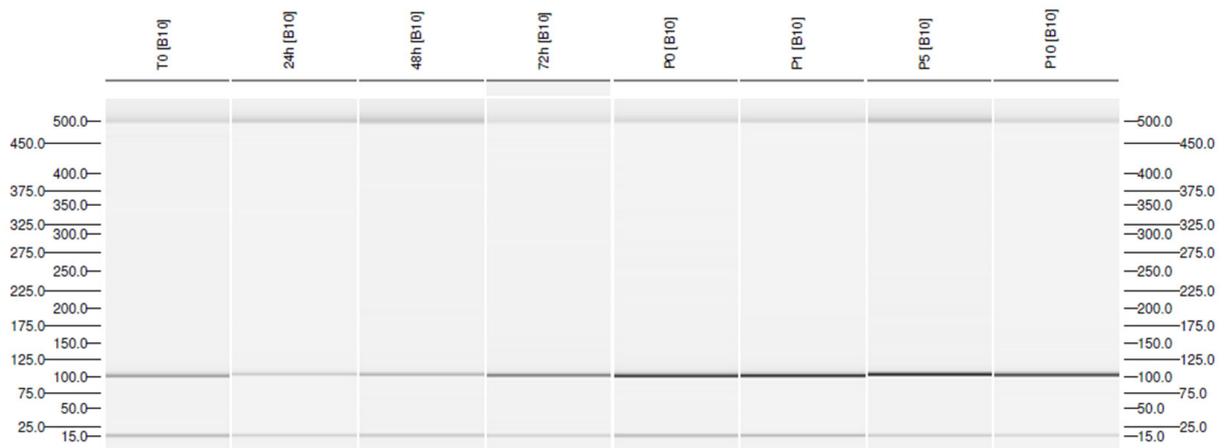


Abbildung 18: Kapillargelelektrophorese für das Gen Col12a1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

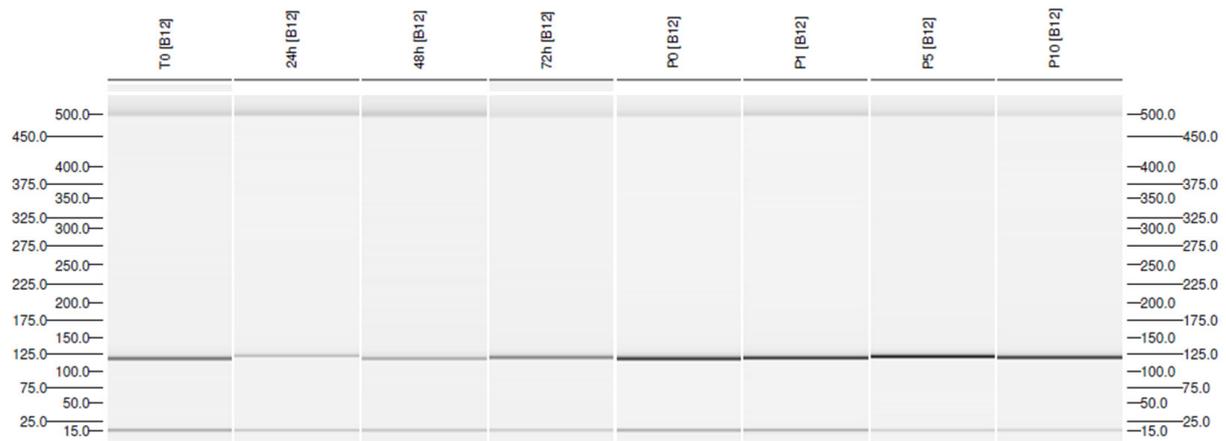


Abbildung 19: Kapillargelelektrophore für das Gen FGF7 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

Untersuchungen zur Herkunft und Charakterisierung der stammzellartigen Zellpopulation

- Charakterisierung der Zellpopulation

Tabelle 6: Relative Expression muriner exokriner Pankreazellen. n=3.

	Gewebe	P0	P1	P2	P3	P4	P5
Ki67	1	0,66	0,58	0,62	0,58	0,76	0,44
Oct4	0	0	0	0	0	0	0
NF L	0	1	0	0	0	0	0
NF M	0	1	0,06	0,02	0	0,01	0,008
NF H	0	0	0	0	0	0	0
KLF4	1	0,08	0,25	0,24	0,19	0,14	0,12
Nestin	1	1,12	0,34	0,28	0,33	0,29	0,17
Amylase	1	$3,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$7,8 \times 10^{-7}$	$2,7 \times 10^{-6}$	$3,2 \times 10^{-7}$	$1,7 \times 10^{-7}$
α -SMA	1	20,24	15,58	8,01	29,7	12,38	7,58
PDX1	1	0,005	0,003	0	0	0	0

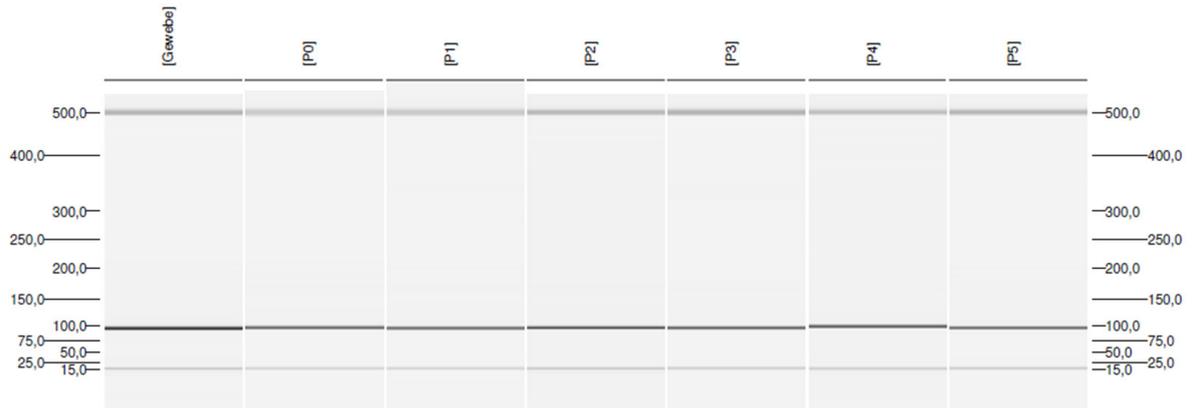


Abbildung 20: Kapillargelelektrophorese für das Gen AMY1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

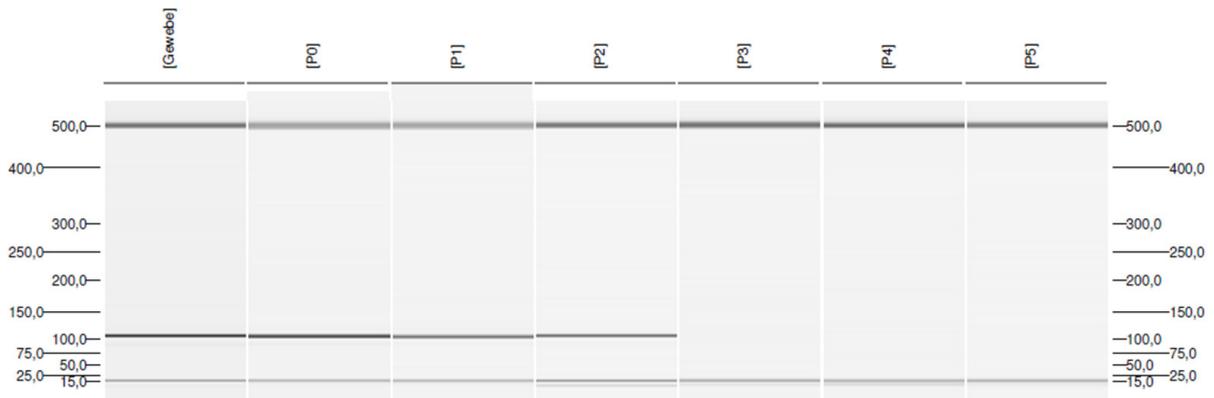


Abbildung 21: Kapillargelelektrophorese für das Gen PDX1 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

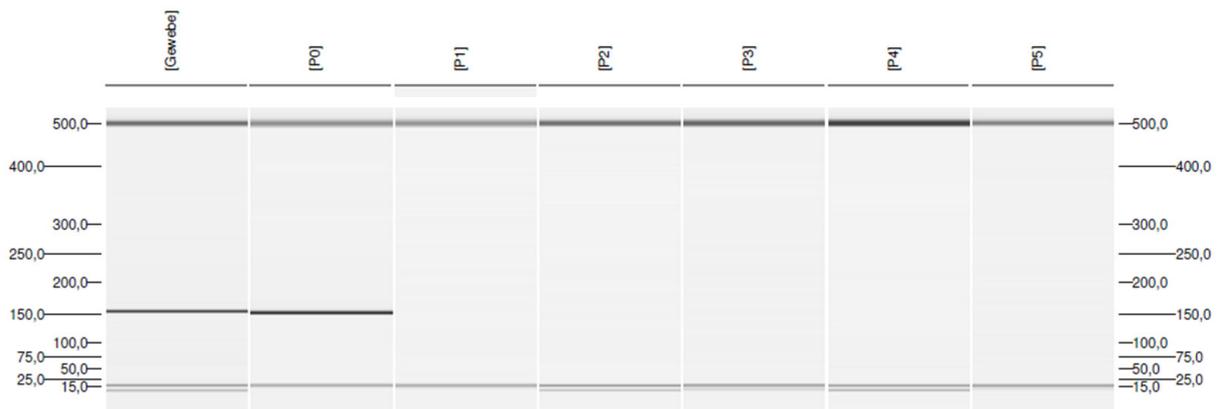


Abbildung 22: Kapillargelelektrophorese für das Gen NFL über den gesamten Kultivierungszeitraum.

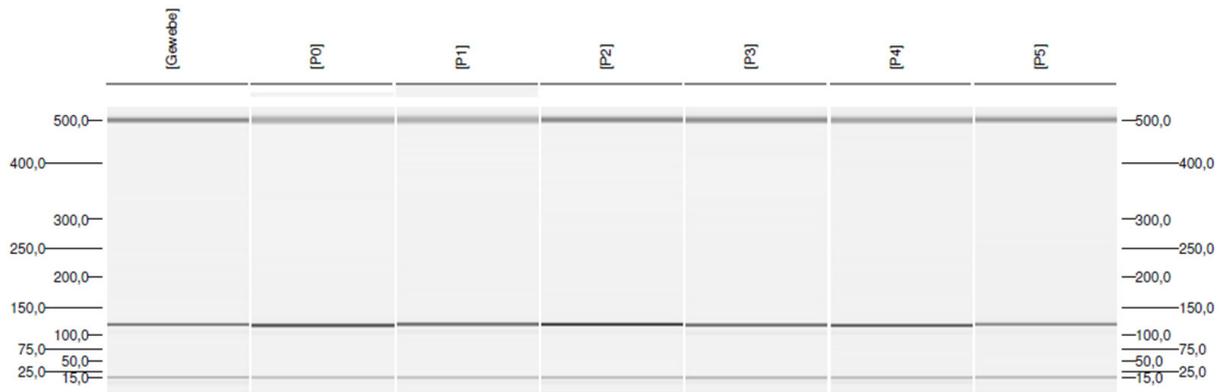


Abbildung 23: Kapillargelelektrophorese für das Gen NFM über den gesamten Kultivierungszeitraum.

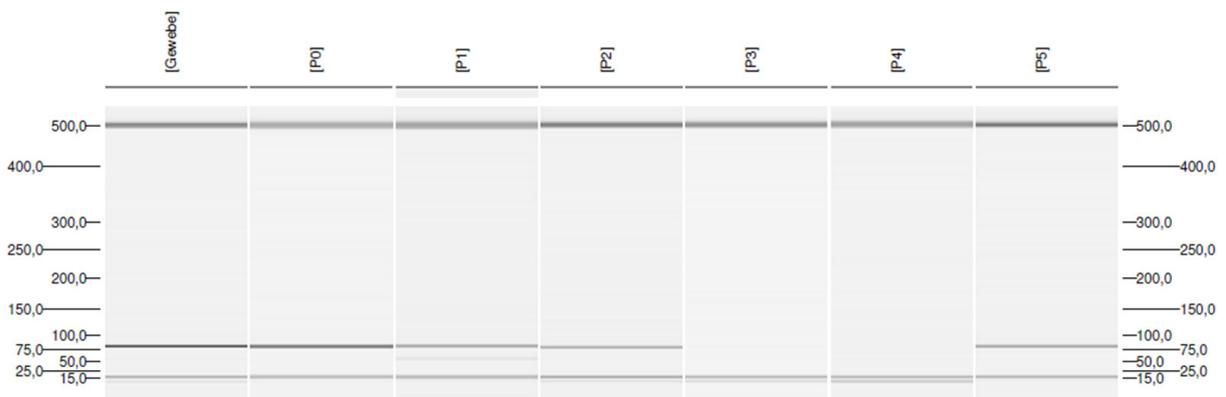


Abbildung 24: Kapillargelelektrophorese für das Gen NFH über den gesamten Kultivierungszeitraum.

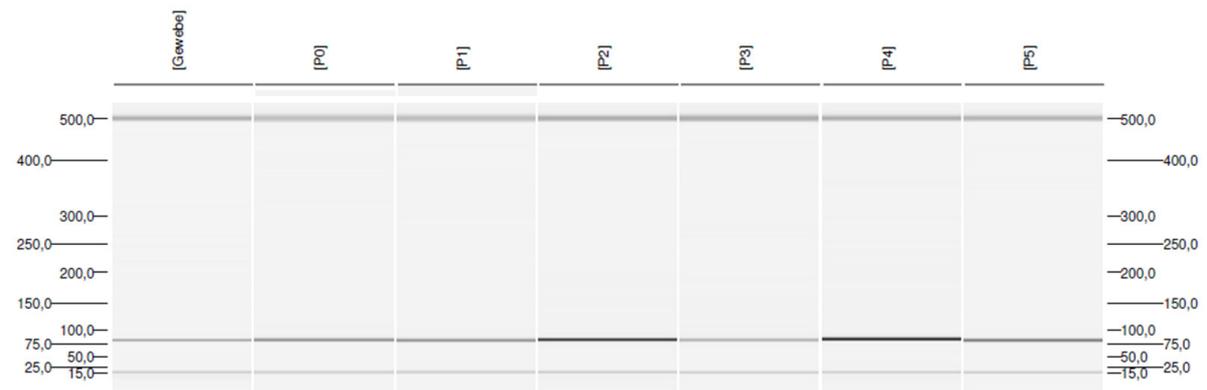


Abbildung 25: Kapillargelelektrophorese für das Gen α -SMA über den gesamten Kultivierungszeitraum.

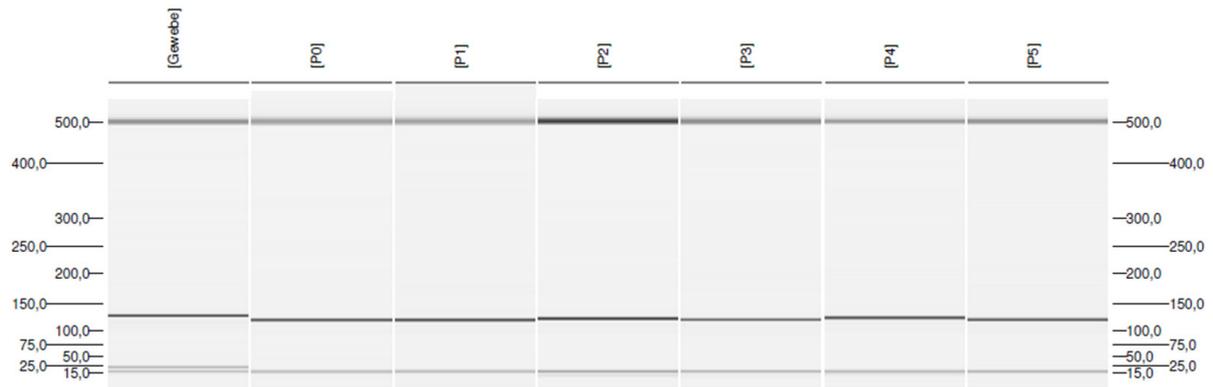


Abbildung 26: Kapillargelelektrophorese für das Gen Nestin über den gesamten Kultivierungszeitraum.

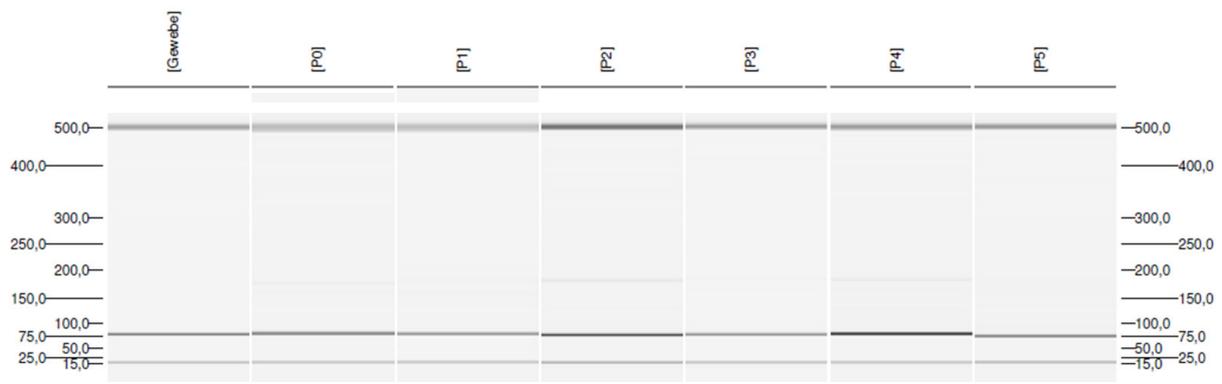


Abbildung 27: Kapillargelelektrophorese für das Gen KLF4 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

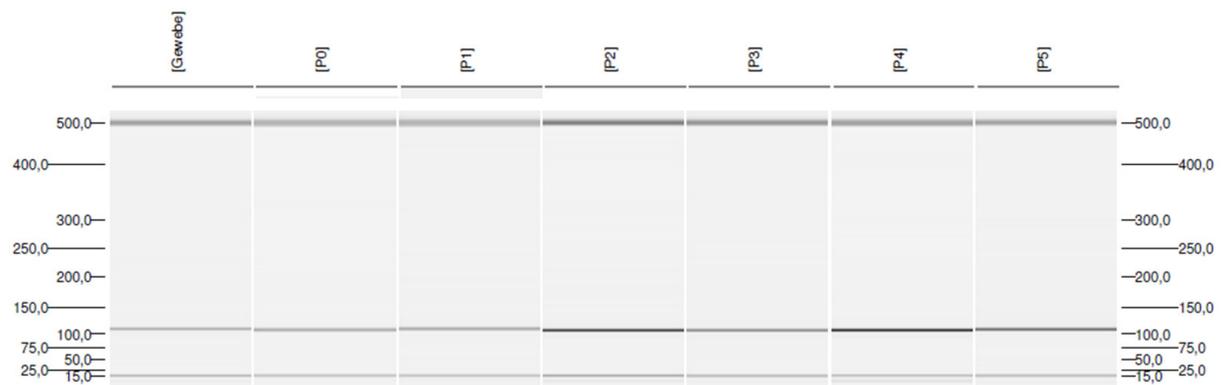


Abbildung 28: Kapillargelelektrophorese für das Gen Ki67 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

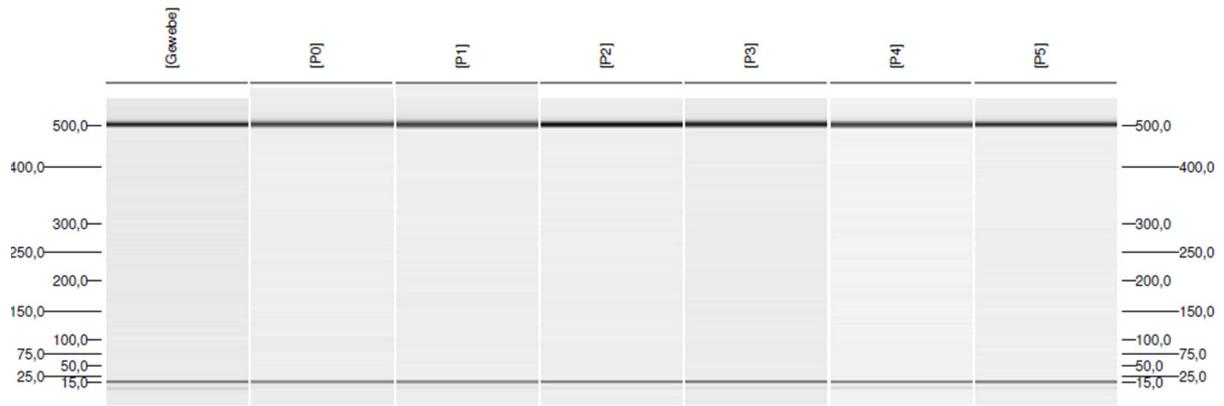


Abbildung 29: Kapillargelelektrophorese für das Gen Oct-4 über den gesamten Kultivierungszeitraum.

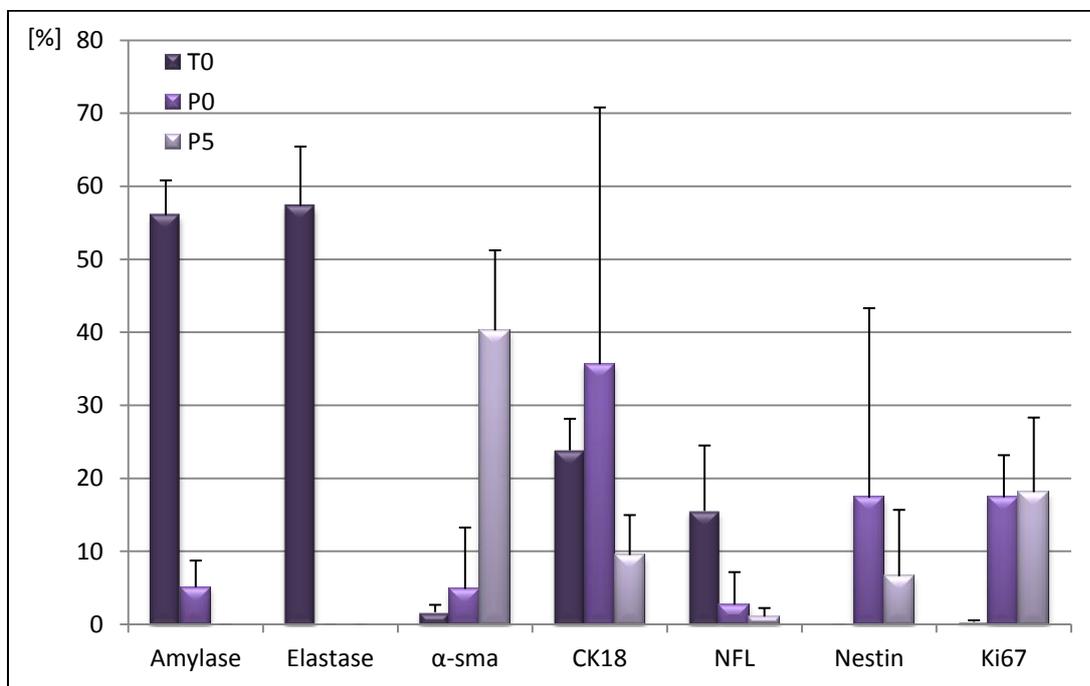


Abbildung 30: Analyse der Proteinexpression von Zellen im Gewebe und in den Passagen 0 und 5 mittels Immunfluoreszenzfärbung. Anzahl positiver Zellen in Prozent. n=3, SEM.

Tabelle 7: Analyse der Proteinexpression muriner Pankreaszellen mittels Fluoreszenzfärbung. Anzahl der positiven Zellen in Prozent.

	T0	Passage 0	Passage 5
Amylase	56,05	5,08	0
Elastase	57,32	0	0
α-SMA	1,67	4,85	40,25
CK18	23,83	35,63	9,49
NF-L	15,53	2,71	1,07
NF-M & H	0	0	0
Nestin	0	17,35	6,60
Ki67	0,35	17,39	18,11

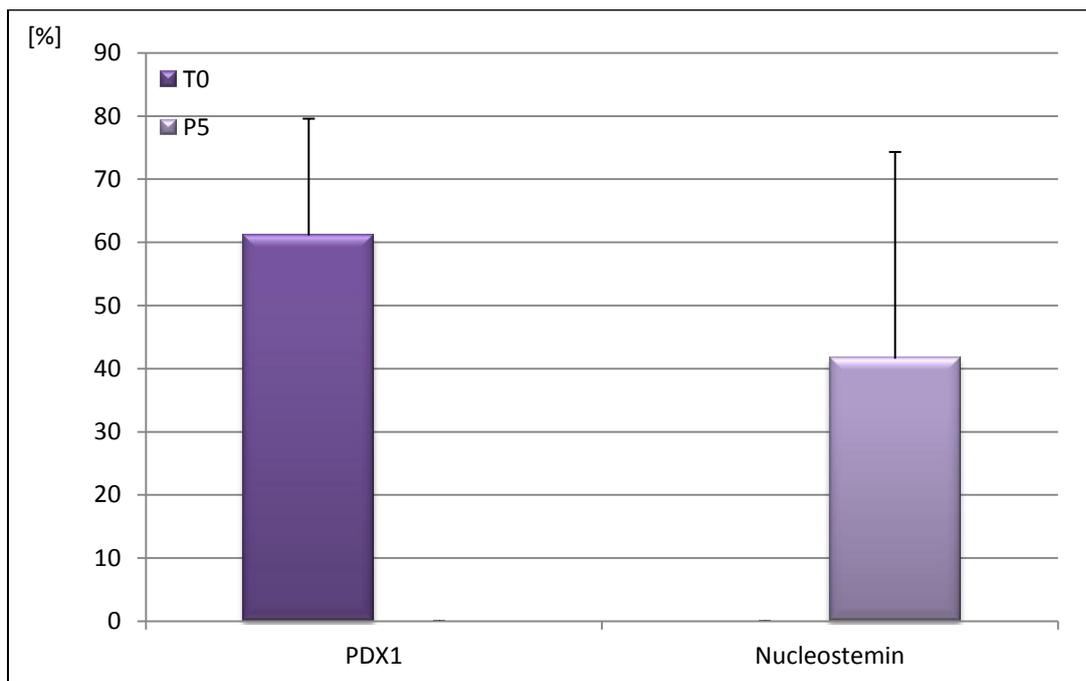


Abbildung 31: Analyse der Proteinexpression von Zellen im Gewebe und in der Passagen 5 mittels Immunfluoreszenzfärbung. Anzahl positiver Zellen in Prozent. n=3, SEM.

Tabelle 8: Analyse der Proteinexpression muriner Pankreaszellen mittels Fluoreszenzfärbung. Anzahl der positiven Zellen in Prozent.

	T0	Passage 5
PDX1	61,07	0
Nukleostemin	0	41,57
Oct 4	0	0
Nanog	0	0
Sox2	0	0
KLF4	0	0

- **Untersuchung der Herkunft der Zellpopulation**

Tabelle 9: Anteil an β -Galactosidase exprimierenden Zellen in Prozent.

Zeitpunkt	Probe	Anteil an positiven Zellen [%]	Ø Anteil an positiven Zellen [%]
T0	MApan88b	70,9	
	MApan92b	10,44	
	MApan93b	43,15	41,50
P0	MApan91b	15,96	
	MApan92b	5,95	
	MApan93b	28,71	16,87
P1	MApan88b	9,24	
	MApan89b	25,90	
	MApan91b	7,52	
	MApan92b	2,46	
	MApan93b	20,86	13,20
P2	MApan88b	26,27	
	MApan89b	20,32	
	MApan91b	17,31	
	MApan92b	26,49	
	MApan93b	51,46	28,37
P3	MApan88b	16,73	
	MApan89b	18,57	
	MApan91b	0,62	
	MApan92b	27,84	
P4	MApan93b	21,08	16,97
	MApan88b	13,08	
	MApan89b	8,65	
	MApan91b	0,9	
	MApan92b	26,91	
P5	MApan93b	1,53	10,21
	MApan88b	0,45	
	MApan89b	0,72	
	MApan91b	0,18	
	MApan92b	7,14	
	MApan93b	0,35	1,76

Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Inkulturnahme und Kultivierung von Zellen

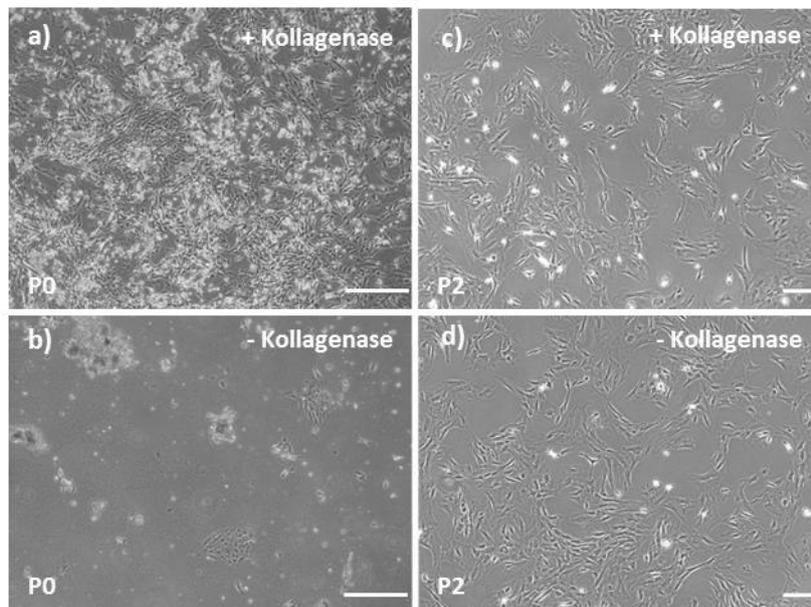


Abbildung 32: Mit bzw. ohne Kollagenase isolierte Speicheldrüsenzellen. Nach sieben Tagen in Kultur sind die mit Kollagenase isolierten Zellen nahezu konfluent (a), während zu diesem Zeitpunkt bei den ohne Kollagenase isolierten Zellen erst wenige Zellen adhären sind (b). In Passage 2 sind keine morphologischen Unterschiede mehr erkennbar (c+d). Bilder sind in Graustufen dargestellt, Maßstabsbalken: 200 μm .

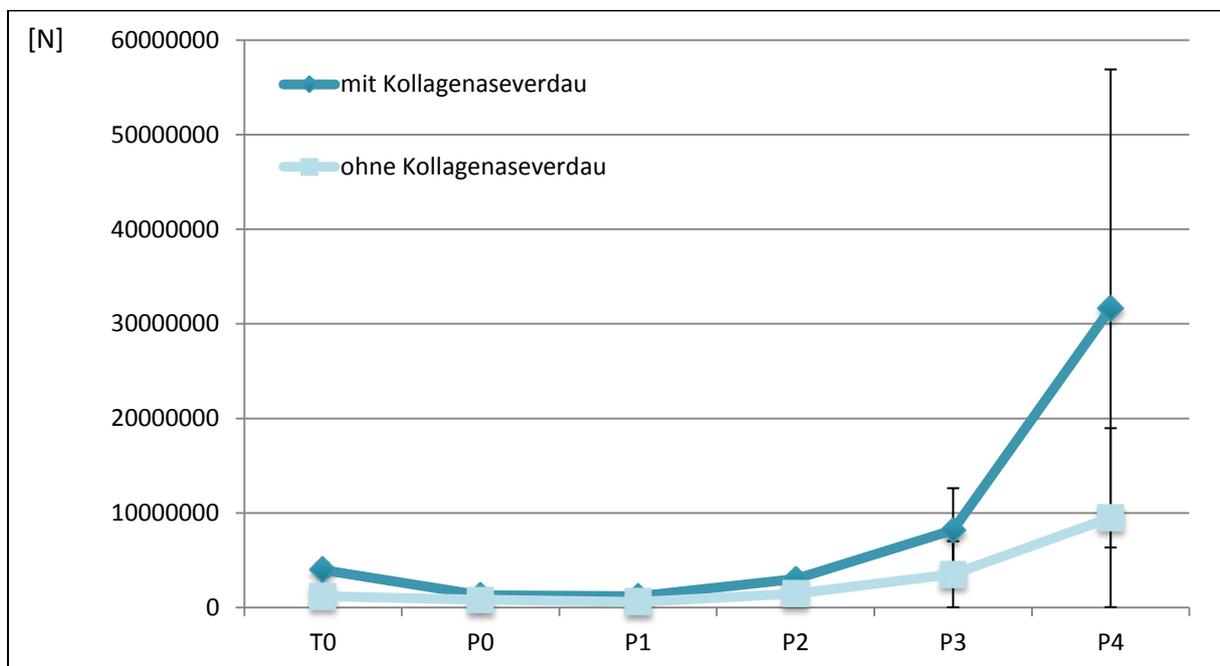


Abbildung 33: Wachstum von exokrinen Zellen, die mit bzw. ohne Kollagenase isoliert wurden. Die Zellzahl wurde direkt nach der Isolation (T0), sowie am Ende jeder Passage (P=Passage) bestimmt. N=Zellzahl; n=3; SEM.

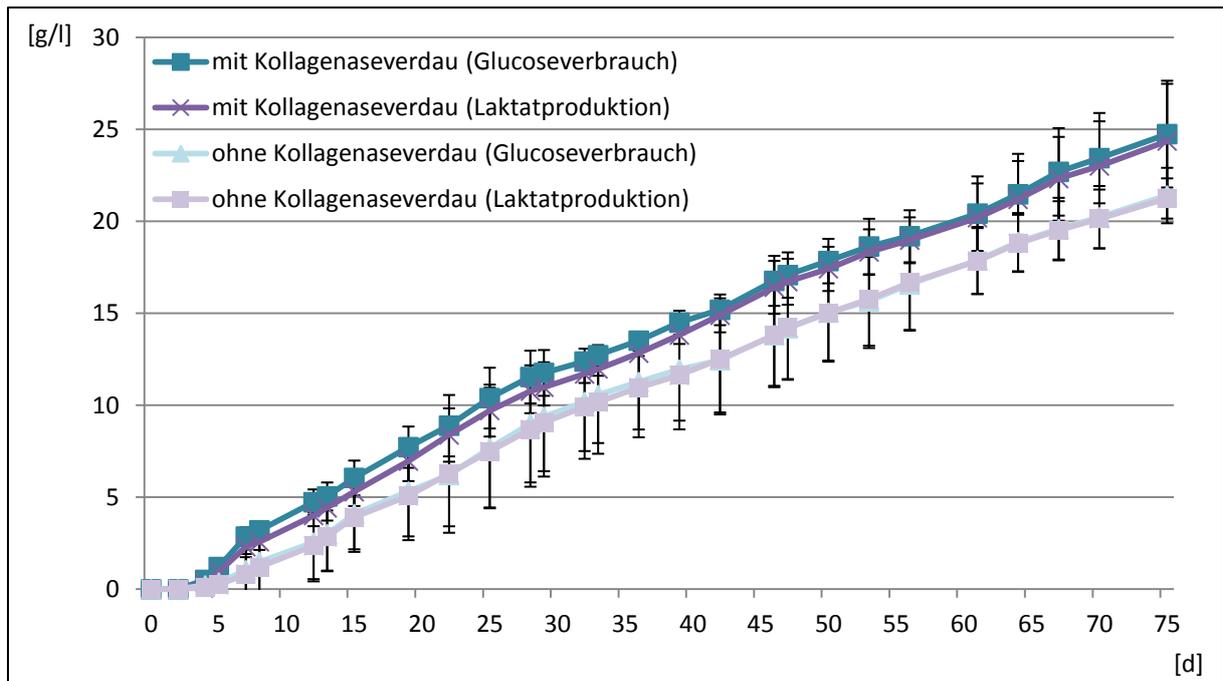


Abbildung 34: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit bzw. ohne Kollagenase isoliert wurden. Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde vor jedem Medienwechsel eine Probe entnommen und der Glukose- und Laktatgehalt bestimmt. Die Stoffwechselaktivität wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen gemessen. n=3; SEM.

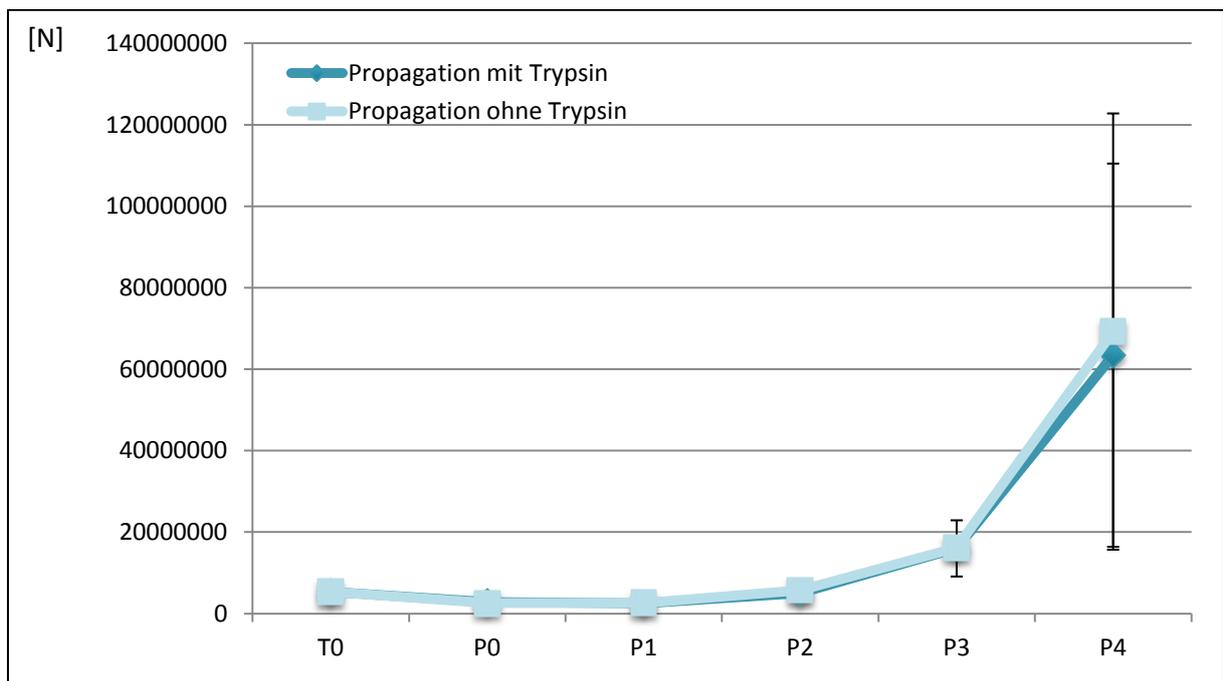


Abbildung 35: Wachstum von exokrinen Zellen, die mit bzw. ohne Trypsin propagiert wurden. Die Zellzahl wurde direkt nach der Isolation (T0), sowie am Ende jeder Passage (P=Passage) bestimmt. N=Zellzahl; n=3; SEM.

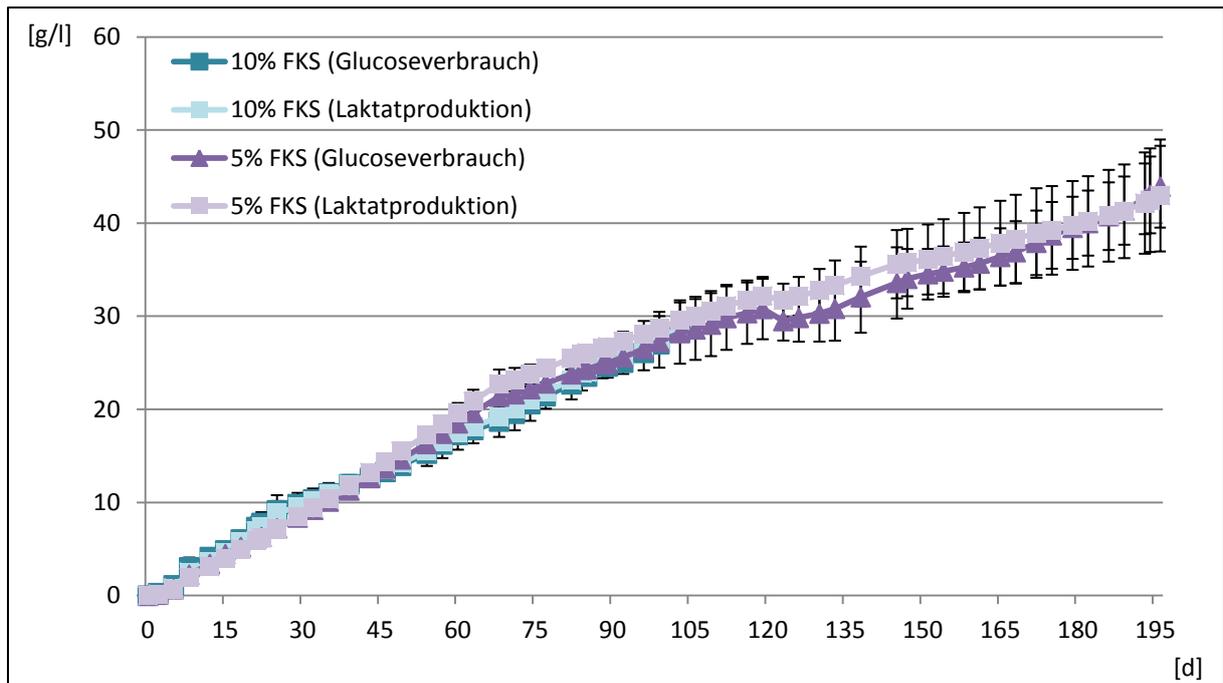


Abbildung 36: Stoffwechselaktivität von exokrinen Speicheldrüsenzellen, die mit 5 % oder 10 % Serum kultiviert wurden. Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde vor jedem Medienwechsel eine Probe entnommen und der Glukose- und Laktatgehalt bestimmt. Die Stoffwechselaktivität wurde über den gesamten Kultivierungszeitraum von fünf Passagen gemessen. n=3, SEM.