

# **Zelltransplantation im Tiermodell der akuten und chronischen Leberschädigung**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Sandra Brückner

geb. am 24.06.1982 in Wolfen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. H.-H. Kaatz  
Prof. Dr. rer. nat. G. Moritz  
Prof. Dr. med. A. Nüssler  
Verteidigung: 18.07.2014

ADM:	adipogenes Differenzierungsmedium
AFP:	Alpha-1-Fetoprotein
AIF:	<i>Apoptosis inducing factor</i>
ALT:	Alanin-Aminotransferase
ALF:	<i>acute liver failure</i>
AST:	Aspartat-Aminotransferase
ASH:	<i>alcoholic steato-hepatitis</i>
BCIP:	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- Phosphat
BSA:	Bovines Serumalbumin
cDNA:	<i>complementary DNA</i>
CPP:	Collagenase-Perfusionspuffer
CV:	Zentralvene
DAB:	Diaminobenzidin
DAPI:	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O:	Bi-destilliertes Wasser
DPPIV:	Dipeptidylpeptidase IV
DSO:	Deutsche Stiftung Organtransplantation
EGF:	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EM6F:	Erhaltungsmedium mit 6 Faktoren
EROD:	Ethoxyresorufin-0-deethylase
FACS:	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung
FITC:	Fluoresceinisothiocyanat
FKS:	Fetales Kälberserum
GS:	Glutaminsynthetase
HE:	Übersichtsfärbung mit Hämalaun und Eosin
HGF:	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HGM:	Hepatozytenwachstumsmedium
hMSC:	humane mesenchymale Stammzellen
HPC:	hepatische Progenitorzellen
HRP:	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC:	hämatopoetische Stammzellen
i.p.:	<i>intraperitoneal</i>
i.v.:	<i>intravenös</i>

IDO:	2,3-Dioxygenase
INR:	<i>International Normalized Ratio</i> des Quick-Werts
ITS:	Insulin-Transferrin-Selen
KG:	Körpergewicht
LPL:	Lipoproteinlipase
MSC:	mesenchymale Stammzellen
NAPQI:	N-acetyl-p-benzochinonimin
NASH:	<i>nonalcoholic steato-hepatitis</i>
nd:	undifferenziert
NPC:	Nichtparenchymzellen
ODM:	osteogenes Differenzierungsmedium
ON:	Osteonectin
PAS:	<i>Periodic Acid Schiff</i>
pATsub-MSC:	MSC aus porcinem subkutanem Fettgewebe
pATvis-MSC:	MSC aus porcinem viszeralem Fettgewebe
pBM-MSC:	MSC aus porcinem Knochenmark
PBS:	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCNA:	<i>Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen</i>
PCR:	Polymerase- Kettenreaktion
PE:	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub> :	Prostaglandin E2
PPP:	Prä-Perfusionspuffer
PROD:	Pentoxyresorufin-O-deethylase
PV:	Portalvene
RH:	primäre Rattenhepatozyten
rMSC:	mesenchymale Stammzellen der Ratte
RNA:	Ribonukleinsäure
RT:	Raumtemperatur
RT-PCR:	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SV:	Schwanzvene
TGF $\beta$ :	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i>
TUNEL:	<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1.1	Funktioneller Aufbau der Leber	6
1.1.2	Leberregeneration	7
1.1.3	Lebererkrankungen	8
1.1.4	Akute Leberschädigung durch Paracetamol	9
1.1.5	Zirrhose als chronische Lebererkrankung	10
1.1.6	Lebertransplantation	11
1.1.7	Immunsuppression	11
1.1.8	Zelltransplantation bei Lebererkrankungen	13
1.1.9	Hepatozytentransplantation	13
1.1.10	Transplantation von mesenchymalen Stammzellen	15
1.1.11	Großtiermodell	16
<b>2</b>	<b>ZENTRALE FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkulturarbeiten</b>	<b>19</b>
3.1.1	Zellisolierung	19
3.1.1.1	Hepatozytenisolierung aus der Ratte	19
3.1.1.2	Hepatozytenisolierung aus dem Schwein	20
3.1.1.3	Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe der Ratte	21
3.1.1.4	Isolierung humaner MSC aus dem Knochenmark	22
3.1.1.5	Isolierung porciner MSC aus dem Fettgewebe und Knochenmark	22
3.1.2	Zellkultivierung	22
3.1.2.1	MSC	22
3.1.2.2	Porcine Hepatozyten	23
3.1.3	Durchflusszytometrische Analysen	23
3.1.3.1	Charakterisierung der auf MSC spezifisch exprimierten Oberflächenmoleküle	23
3.1.3.2	Quantifizierung der Repopularisierung des Empfängerleberparenchyms durch Spenderhepatozyten	24
3.1.4	Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen	24
3.1.4.1	Adipogene Differenzierung	24
3.1.4.2	Osteogene Differenzierung	25
3.1.4.3	Hepatogene Differenzierung	25
3.1.5	Funktionsassays	25
3.1.5.1	Cytochrom P 450-Aktivität	25
3.1.5.1.1	Enzymaktivität des CYP1A1 (EROD=Ethoxyresorufin-O-deethylase)	25
3.1.5.1.2	Enzymaktivität des CYP2B1 (PROD=Penoxiresorufin-O-deethylase)	26
3.1.5.2	Harnstoffsynthese	26
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Arbeiten</b>	<b>27</b>
3.2.1	RNA Isolierung	27
3.2.2	cDNA-Synthese	27
3.2.3	PCR	27

<b>3.3</b>	<b>Histologische und Immunhistologische Arbeiten .....</b>	<b>28</b>
3.3.1	Anfertigung von Kryoschnitten .....	28
3.3.2	Anfertigung von Paraffinschnitten .....	28
3.3.3	Zyto- und Histochemie .....	29
3.3.3.1	CD26-Nachweis an Kryoschnitten .....	29
3.3.3.2	PAS-Nachweis von Glykogen in kultivierten Zellen .....	30
3.3.3.3	Nachweis von Lipiden in kultivierten Zellen mit Sudan III .....	30
3.3.3.4	Nachweis der alkalischen Phosphatase mit BCIP in der Zellkultur .....	30
3.3.3.5	HE-Färbung an Paraffinschnitten .....	30
3.3.3.6	Sirius red-Färbung an Paraffinschnitten .....	31
3.3.4	Immunzyto- und histochemie .....	31
3.3.4.1	Nachweis von Kupferzellen mittels anti-His-36 Färbung in isolierten NPCs .....	31
3.3.4.2	Nachweis von Endothelien mittels OX-43 Färbung an Kryoschnitten .....	32
3.3.4.3	GS-Färbung an Paraffinschnitten .....	32
3.3.4.4	GS-/AIF Doppelfärbung an Paraffinschnitten .....	32
3.3.4.5	Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode auf Paraffinschnitten .....	33
3.3.4.6	Nachweis proliferierender Hepatozyten mittels Ki67-Färbung auf Paraffinschnitten .....	33
3.3.4.7	Nachweis proliferierender Hepatozyten mittels PCNA-Färbung auf Paraffinschnitten .....	34
3.3.4.8	Nachweis humaner Zellen mittels HepPar1-Färbung auf Paraffinschnitten .....	35
<b>3.4</b>	<b>Tierexperimentelle Arbeiten .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Zelltransplantation .....	36
3.4.1.1	Hepatozytentransplantation in der Ratte .....	36
3.4.1.2	Stammzelltransplantation in der Maus .....	36
3.4.1.3	Systemische Stammzelltransplantation in der Ratte .....	37
3.4.2	Vorbehandlung der Empfängertiere .....	38
3.4.2.1	Retrorsin .....	38
3.4.2.2	Propranolol .....	38
3.4.3	Immunsuppression .....	38
3.4.3.1	Behandlung mit Cyclosporin A .....	38
3.4.3.2	Behandlung mit Mycophenolat .....	38
3.4.3.3	Behandlung mit Gadoliniumchlorid .....	38
3.4.4	Akute Leberschädigung durch Paracetamolintoxikation .....	39
3.4.5	Chronischen Leberschädigung durch CCl <sub>4</sub> -Inhalation .....	39
3.4.6	Blutentnahme und Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung der Laborparameter .....	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der zeitabhängigen Integration syngener und allogener Hepatozyten nach Transplantation im Rattenmodell .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2</b>	<b>Immunsuppression nach allogener Hepatozytentransplantation .....</b>	<b>43</b>
4.2.1	Lebermakrophagen sind notwendig aber nicht ausschließlich an der Abstoßung beteiligt .....	43
4.2.2	Beteiligung von T- und B-Zellen an der Abstoßung von Hepatozytentransplantaten .....	44
<b>4.3</b>	<b>Verbesserung der Repopularisierung des Empfängerparenchyms durch Cyclosporin A im syngenem Transplantationsmodell .....</b>	<b>46</b>
<b>4.4</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe der Ratte als Alternative zu Hepatozyten für die Transplantation .....</b>	<b>49</b>

<b>4.5</b>	<b>Applikation von mesenchymalen Stammzellen bei akuter Leberschädigung.....</b>	<b>53</b>
4.5.1	Wirkung von rMSC auf die durch Paracetamol induzierte akute Leberschädigung in der Ratte...	53
4.5.2	Wirkung von humanen MSC (hMSC) auf die durch Paracetamol induzierte akute Leberschädigung in der Maus .....	58
<b>4.6</b>	<b>Applikation von mesenchymalen Stammzellen (rMSC) bei chronischer Leberschädigung im Rattenmodell .....</b>	<b>60</b>
<b>4.7</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung der hepatogenen Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen aus dem Schwein .....</b>	<b>67</b>
4.7.1	Durchflusszytometrische Analyse ausgewählter Oberflächenmoleküle .....	67
4.7.2	Multiple Differenzierungsfähigkeit.....	68
4.7.3	Hepatozytäre Differenzierung von MSC: Änderung der Zellmorphologie und Glykogeneinlagerung .....	69
4.7.4	Harnstoffsynthese in hepatozytär differenzierten MSC .....	71
4.7.5	Cytochrom P450 Aktivität .....	72
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Verbesserung der Effizienz der Hepatozytentransplantation durch pharmakologische Maßnahmen.....</b>	<b>75</b>
5.1.1	Selektive Immunsuppression bei Leberzelltransplantation .....	75
5.1.2	Cyclosporin A verbessert die Repopularisierung des Empfängerparenchyms durch die Spenderhepatozyten .....	76
<b>5.2</b>	<b>Stammzellbasierte Hepatozytentransplantation bei akuter und chronischer Leberschädigung</b>	<b>78</b>
5.2.1	Therapeutisch nutzbare Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen .....	78
5.2.2	Pro-regenerative Wirkung mesenchymaler Stammzellen bei akuter Leberschädigung .....	80
5.2.3	Anti-fibrotische Wirkung mesenchymaler Stammzellen bei chronischer Leberschädigung.....	82
<b>5.3</b>	<b>Hepatozytäre Differenzierung von porcinen mesenchymalen Stammzellen.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>96</b>

# 1 Einleitung

## 1.1.1 Funktioneller Aufbau der Leber

Die Leber als zentrales Stoffwechselorgan ist im Oberbauch lokalisiert und erfüllt eine Reihe von wichtigen Funktionen. So ist die Leber nicht nur in den Glucose- und Fettstoffwechsel involviert, es werden auch Plasmaproteine wie Gerinnungsfaktoren, Akut-Phase-Proteine, Albumin und Galle von der Leber gebildet und ins Blut oder die Gallenflüssigkeit abgegeben. Eine zentrale Aufgabe ist es weiterhin, Fremdstoffe wie Medikamente und körpereigene toxische Substanzen wie Ammoniak und Bilirubin zu entgiften.

Die Leber ist von einer Bindegewebskapsel, der *Tunica fibrosa* umgeben. Das Leberläppchen bildet die kleinste anatomische Einheit der Leber und setzt sich aus den Hepatozyten (Leberparenchymzellen) und den Nichtparenchymzellen (z. B. Endothel-, hepatische Stern-, Kupfferzellen) zusammen (siehe Abbildung 1). An der so genannten *Glissonschen Trias* grenzen 3 Leberläppchen aneinander, in welcher ein Ast der Leberarterie (*Arteria interlobularis*) und der Portalvene (*Vena interlobularis*) sowie ein Gallengang (*Ductus interlobularis*) aufeinander treffen. Die Hepatozyten sind polare Zellen mit basaler und apikaler Seite. Sie sind in Leberbälkchen angeordnet, welche radial und parallel entlang der Sinusoide auf die Zentralvene (*Vena centralis*) zulaufen. Die apikale Zellmembran zweier benachbarter Hepatozyten in den Leberbälkchen bildet durch Einstülpungen die Gallengangskapillaren, welche die Galle bis zu den in der *Glissonschen Trias* lokalisierten Gallengängen transportieren. Über die Sinusoide wird sauerstoffreiches Blut aus der Leberarterie und nährstoffreiches Blut aus der Pfortader bis zur Zentralvene transportiert und wieder aus der Leber geleitet. Die Sinusoide werden von Endothelzellen ausgekleidet, welche keine Basalmembran besitzen und gefenstert sind (gefensterte Sinuskapillaren). So ist es Nährstoffen und auch großen Molekülen möglich, aus den Sinusoiden in den Raum zwischen Endothelzelle und Hepatozyt (Dissé-Raum) zu gelangen und die Hepatozyten direkt zu umspülen. Der Stoffaustausch zwischen den Hepatozyten und dem Blut erfolgt über Diffusion entlang chemischer Gradienten. Weiterhin sind im Dissé-Raum die hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen) lokalisiert. Sie fungieren dort als Vitamin A-Speicher und regulieren den sinusoidalen Gefäßwiderstand [1]. In den Sinusoiden liegen den Endothelzellen die leberresidenten Makrophagen (Kupfferzellen)

auf, deren Fortsätze durch die gefensterten Endothelien durchtreten und bis in den Dissé-Raum reichen.

Funktionell gliedern sich die Leberläppchen entlang eines sinusoidalen Substrat- und Metabolitgradienten in 3 Zonen. Die die Verzweigungen der Portalvene umgebende periportale Zone 1 weist einen hohen Sauerstoffpartialdruck auf. Hier finden vorwiegend Stoffwechselforgänge wie z.B. die Synthese von Harnstoff, der Abbau von Aminosäuren, Gluconeogenese und Glykogenabbau zu Glucose statt. Die die Verzweigungen der Zentralvene umgebende perivenöse Zone 3 ist die Zone mit dem geringsten Sauerstoffpartialdruck. Hier erfolgen vorwiegend die Detoxifikationsprozesse über das Cytochrom P450-System, die Synthese von Lipiden, Glutamin und der Abbau von Glykogen zum Lactat. Zone 2 zwischen dem periportalen und dem perivenösen Bereich des Leberläppchens, stellt eine Übergangszone mit überlappenden Funktionen dar.

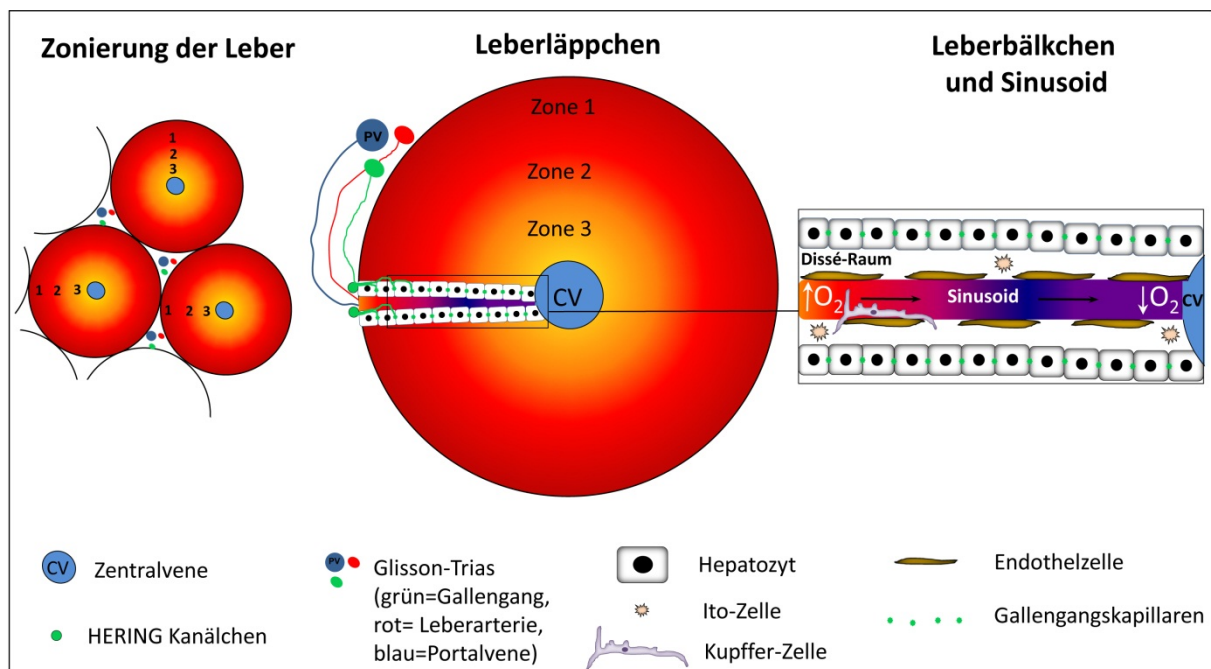


Abb.1 **Histologie der Leber**

modifiziert nach: [http://de.wikibooks.org/wiki/Leber:\\_Anatomie](http://de.wikibooks.org/wiki/Leber:_Anatomie) (12.02.2013)

### 1.1.2 Leberregeneration

Die Leber zeichnet sich weiterhin durch ein enormes Regenerationspotential aus. So wurde durch Higgins und Anderson bereits 1931 [2] beschrieben, dass in Folge einer 70 % igen Hepatektomie die Leberarchitektur durch kompensatorisches Wachstum bereits nach zehn Tagen wieder vollständig hergestellt ist [3]. Das komplexe Geschehen der Leberregeneration ist noch nicht in allen Teilen verstanden. An der Regeneration der Leber sind je nach Art der Leberschädigung verschiedene Zellen beziehungsweise



Zellkompartimente beteiligt. Die Replikation von Hepatozyten zur Regeneration der Leber ist der schnellste und effektivste Weg. So proliferieren zum Beispiel nach einer partiellen Hepatektomie [4] oder bei der Regeneration nach Paracetamolintoxikation [5] die ausdifferenzierten Hepatozyten. Wenn aber die Replikation der reifen Hepatozyten verzögert oder vollständig blockiert ist, kommt es zur Replikation und anschließenden Differenzierung von Ovalzellen in reife Hepatozyten [6]. Dies ist für experimentelle Leberschädigungen durch Galactosamin [7], Cholin-defiziente Diäten [8] und partielle Hepatektomien in Kombination mit dem karzinogen Acetylaminofluoren (AAF) [9] der Fall. Sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten gehen in der Embryonalentwicklung aus Hepatoblasten hervor. In der adulten Leber gibt es ein heterogenes Zellkompartiment, das Ovalzell-Kompartiment, welches sich durch Zellen verschiedener Differenzierungskapazität und Differenzierungsstadien auszeichnet. Einige Zellen dieses Kompartiments fungieren als Hepatozyten-Progenitorzellen, während andere von ihren Oberflächenmolekülen nicht von Cholangiozyten zu unterscheiden sind. Sie exprimieren neben Kreatin 7 zum Beispiel OV6. In der humanen Leber gibt es hepatische Progenitorzellen (HPC), welche den Ovalzellen in Nagern ähnlich sind [6], sie zeichnen sich durch die Expression folgender Oberflächenmarker aus: Kreatin 7, NCAM und CD133. Während der Differenzierung in Cholangiozyten oder Hepatozyten verändert sich die Expression dieser Oberflächenmarker [10]. Die Proliferation und Differenzierung dieses Zellkompartiments wird als atypische duktiläre Reaktion bezeichnet und Zellabkömmlinge daraus als duktiläre Hepatozyten. Das regenerative Potential ist ebenso faszinierend wie komplex und kann einige Leberschädigungen kompensieren. Dennoch sind Schädigungen des Leberparenchyms, bzw. Erkrankungen der Leber vielfältig und können ab einem bestimmten Grad durch das regenerative Potential der Leber nicht mehr kompensiert werden. Ein Überblick über die verschiedenen Erkrankung bietet der nachfolgende Abschnitt.

### **1.1.3 Lebererkrankungen**

Erkrankungen der Leber sind vielfältig und können wie zum Beispiel die Hämochromatose, die Wilson-Krankheit und das Crigler-Najjar-Syndrom genetisch bedingt sein [11-13]. Neben diesen angeborenen, sogenannten metabolischen Lebererkrankungen, deren Pathogenese wesentlich durch die Akkumulation von hepatotoxischen Metaboliten bestimmt wird, und der Autoimmunhepatitis [14] können andere Formen der Leberentzündung auch durch verschiedene hepatotrope Viren ausgelöst werden. Alle genannten Lebererkrankungen führen zu chronischen Hepatitiden. Diese und

andere entzündliche Lebererkrankungen wie zum Beispiel die alkoholische Steatohepatitis (ASH: *alcoholic steato hepatitis*) und die nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH: *non-alcoholic-steato hepatitis*) können im weiteren Krankheitsverlauf zu einem fibrotischen Umbau des Leberparenchyms (Leberzirrhose) und damit zu einer eingeschränkten Leberfunktion bzw. zum völligen Funktionsverlust führen.

Neben den chronischen Lebererkrankungen können aber auch Medikamentenüberdosierung (z.B. Paracetamol) oder Pilzvergiftungen eine akute, fulminante Leberschädigung bzw. akutes Leberversagen (ALF: *acute liver failure*) auslösen. Das akute Leberversagen ist ein klinisches Bild, welches bei Patienten ohne vorbestehende Lebererkrankung mit dem rapiden Untergang der Hepatozyten und daraus resultierend dem Verlust der Leberfunktion einhergeht und typischerweise mit Koagulopathie und Encephalopathien assoziiert ist [15].

#### **1.1.4 Akute Leberschädigung durch Paracetamol**

Paracetamol (Para-(Acetyl-amino)phenol) ist ein Nichtopioid-Analgetikum welches in den perivenösen Hepatozyten metabolisiert wird [16]. Es wird einmal durch Sulfatierung oder Glucuronidierung konjugiert und über die Niere ausgeschieden. Zum anderen wird die Substanz durch das Cytochrom P450-Enzymsystem oxidiert. Dabei entsteht das toxische Zwischenprodukt *N*-acetyl-*p*-benzochinonimin (NAPQI), welches mit Glutathion konjugiert, somit inaktiviert und über die Galle ausgeschieden wird. Ist bei einer Überdosierung des Paracetamols das Glutathion in der Leber erschöpft, kommt es durch die Akkumulation von NAPQI zur Bildung von Proteinaddukten sowie von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Diese verursachen letztlich die Apoptose der Hepatozyten. Da Paracetamol in perivenösen Hepatozyten durch das dort lokalisierte Cytochrom P450-Enzymsystem metabolisiert wird entstehen zentrilobuläre Nekrosen, die im fortgeschrittenen Stadium zum akuten Leberversagen führen [17]. Nach einer akuten Leberschädigung durch Paracetamol steigt die Konzentration der Serumtransaminasen AST (Aspartat-Aminotransferase) und ALT (Alanin-Aminotransferase) um ein Vielfaches an. Die Therapieoptionen nach einer Paracetamolintoxikation sind limitiert. Die Behandlung mit Acetylcystein soll dem Körper Cystein als Vorstufe der Glutathionbiosynthese bereitstellen [18]. Beim akuten Leberversagen ist aber oftmals die Lebertransplantation die einzige Therapiemöglichkeit.

### 1.1.5 Zirrhose als chronische Lebererkrankung

Die Zirrhose als Endstadium der chronischen Lebererkrankungen ist definiert durch makroskopische und mikroskopische Leberveränderungen. Durch Zunahme der extrazellulären Matrix bis auf das Zehnfache entstehen Bindegewebsbrücken zwischen benachbarten Portalfeldern und Zentralvenen. Durch die auftretende Störung der Mikrozirkulation kommt es zur Bildung porto-systemischer Shunts, die das Blut am Leberparenchym vorbei direkt in die systemische Zirkulation ableiten. Der bindegewebige Umbau des Leberparenchyms ist die Folge des ständigen Untergangs und der gesteigerten häpatozellulären Regeneration. Dies führt zur Bildung von Regeneratknoten, welche in ihrer Größe variieren können [19]. Der zirrhotische Umbau führt nicht nur zur hepatozellulären Schädigung und damit zum Leberfunktionsverlust, sondern auch zur Verengung der Sinusoide. Dadurch entsteht die portale Hypertension, deren Konsequenzen vielfältig sind. So kommt es zum Beispiel zu gastrointestinalen Varizen, Splenomegalie [20], Aszites und damit verbundener spontaner bakterieller Peritonitis, sowie infolge der eingeschränkten Leberfunktion zur hepatischen Enzephalopathie und Koagulopathie. Anhand des *Child-Turcotte-Pugh-Scores* lässt sich die Zirrhose in Stadium A-C einteilen. Der *Child-Turcotte-Pugh-Score* gibt Aufschluss über die Einjahresüberlebensraten der Patienten und schließt die in Tab.1 aufgeführten 5 Berechnungskriterien als Maß für die Leberfunktion ein [21].

**Tab. 1** *Child-Turcotte-Pugh-Klassifikation der Stadien der Leberzirrhose verändert nach Grattagliano et al. [22]*

Kriterien	CTP-Score			Klassifizierung der Zirrhose Stadien		
	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	Punktzahl	Stadium	1 Jahresüberleben in %
<i>Bilirubin gesamt (mg/dl)</i>	<2,0	2,0-3,0	>3,0	<6	CHILD A	100
<i>INR</i>	< 1,7	1,7-2,3	2,3	7-9	CHILD B	80
<i>Albumin (g/dl)</i>	>3,5	3,0-3,5	<2,8	>10	CHILD C	45
<i>Aszites</i>	kein	gering	ausgeprägt			
<i>Encephalopathie</i>	keine	gering	ausgeprägt			

Medikamentöse Therapieoptionen zielen symptomatisch auf die Senkung des portalvenösen Druckes und die Verbesserung der damit verbundenen Komplikationen ab (Propranolol, Nadonol, Molsidon und Spironolacton [19]). Bei fortgeschrittener Leberzirrhose im CHILD C-Stadium ist jedoch eine Lebertransplantation unausweichlich.

### 1.1.6 Lebertransplantation

Durch die Lebertransplantation wird das nicht-funktionelle erkrankte Organ durch eine funktionelle Spenderleber ersetzt. Die Operation ist aufwendig und hochgradig invasiv. Postoperativ ist eine lebenslange Immunsuppression mit massiven Nebenwirkungen wie zum Beispiel Nephrotoxizität und gesteigerte Tumorneigung erforderlich. Die erste orthotope Lebertransplantation beim Menschen wurde 1963 von Starzl durchgeführt [19]. Die aktuelle Statistik zur Lebertransplantation, die jährlich von der DSO (Deutsche Stiftung Organtransplantation) veröffentlicht wird, belegt 2012 in Deutschland 1097 durchgeführte Lebertransplantationen. Demgegenüber stehen 1689 Patienten auf der Warteliste, die zur Lebertransplantation angemeldet waren.

([www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/lebertransplantation.html](http://www.dso.de/organspende-und-transplantation/transplantation/lebertransplantation.html), 02.09.2013). Dies bedeutet, dass mehr als ein Drittel der Patienten auf der Warteliste kein Spenderorgan erhalten, Zahlen, die sich in den letzten Jahren nicht verbessert haben. Auch alternative Optionen wie Splitlebertransplantation oder Leberlebenspende haben den Mangel an Spenderorganen kaum abmildern können. Daher ist es unabdingbar, alternative Therapieoptionen zu finden. Als Therapieoption neben der Lebertransplantation gibt es auch die Möglichkeit, Leberunterstützungssysteme auf zellulärer („Bioreaktoren“ mit Leberzellen) oder nicht zellulärer Basis (Dialyse- oder Filtrationssysteme) einzusetzen, die sich jedoch bisher klinisch nur als Überbrückungsmaßnahme zur Lebertransplantation durchgesetzt haben. Eine weitere Option ist die Infusion von Zellen mit hepatozytären Eigenschaften, welche die Leberfunktion zeitweise oder sogar langfristig teilweise wiederherstellen sollen („Hepatozytentransplantation“). Diese Eingriffe sind minimalinvasiv und je nach Art der applizierten Zellen dienen sie dazu, entweder das regenerative Potential der Leber (Applikation von mesenchymalen Stammzellen, MSC) oder direkt die Leberfunktion (Hepatozyten) zu unterstützen.

### 1.1.7 Immunsuppression

Um sowohl akute als auch chronische Abstoßungsreaktionen nach einer Lebertransplantation zu vermeiden, ist eine lebenslange immunsuppressive Therapie der Transplantatempfänger unabdingbar. Die Immunsuppressiva lassen sich nach ihrer unterschiedlichen immunologischen Wirkung in Kortikosteroide, Zytostatika, Calcineurin-Inhibitoren, mTOR-Inhibitoren und polyklonale und monoklonale Antikörper unterteilen (siehe Tabelle 2). Die hydrophoben Kortikosteroide binden an zytosolische Rezeptoren, die in den Zellkern wandern und dort die Zytokingene (IL1, IL2, IL3, IL6) regulieren. Über diese Regulation wird die Reifung, Verteilung und Konzentration der Leukozyten

beeinflusst [23]. Das zu den Zytostatika zählende Mycophenolat hingegen ist ein selektiver Inhibitor der Iosin-Monophosphat-Dehydrogenase, blockiert somit die Purinsynthese und inhibiert dadurch den Zellzyklus von T- und B- Lymphozyten in der S-Phase [24]. Azathioprin, ebenfalls ein Zytostatikum wird zu 6-Mercaptopurin (Nukleosid-Analagon) metabolisiert, das mit der DNA interferiert und deren Synthese blockiert [25]. Cyclosporin A, ein Calcineurin-Inhibitor, der aus dem Pilz *Tolytocladium inflatum* isoliert wird, ist ein lipophiles, cyclisches Peptid aus 11 Aminosäuren, welches mit hoher Affinität an die im Zytoplasma vorkommenden Cyclophiline bindet. Dieser Komplex wiederum bindet spezifisch kompetitiv an Calcineurin. Calcineurin ist eine Serin-Threonin-Phosphatase in T-Lymphozyten. Die Bindung des Calcineurins inhibiert die Transkription von verschiedenen Zytokinen, darunter auch die von IL-2, so dass die Proliferation und Aktivierung der T-Lymphozyten selektiv blockiert wird [26].

Inhibitoren des *mammalian target of Rapamycin* (mTOR) wie Sirolimus (Rapamycin) und Everolimus sind im Vergleich zu den Calcineurin-Inhibitoren weniger nephrotoxisch [27]. Sie formen einen Proteinkomplex, welcher mit hoher Affinität an mTOR, eine Serin-Threonin-Kinase mit zentraler Bedeutung in verschiedenen intrazellulären Signalwegen, bindet. Diese beeinflussen das Zellwachstum, die Proliferation, den zellulären Metabolismus sowie auch die Autophagie und Angiogenese. Die T- und B-Zellproliferation wird dadurch effektiv eingeschränkt. Von der Inhibition der Proliferation sind aber auch Fibroblasten, Endothelzellen, Hepatozyten und Zellen der glatten Muskulatur betroffen [28]. Des Weiteren werden mono- und polyklonale Antikörper zur immunsuppressiven Therapie eingesetzt. Dabei bindet der monoklonale Antikörper Okt3 an das für T-Zellen spezifische Oberflächenmolekül CD3, wodurch es zur Komplement-vermittelten Depletion der T-Zellen kommt. Basiliximab und Daclizumab sind monoklonale, humanisierte Antikörper, die an CD25, den IL-2 Rezeptor auf aktivierten T-Zellen, binden und somit den IL-2 Signalweg inhibieren [23].

**Tab. 2** Klassifikation der Immunsuppressiva Quelle: Ryutaro Hirose [29]

	<b>Kortikosteroide</b>	<b>Zytostatika</b>	<b>Calcineurin Inhibitoren</b>	<b>mTOR Inhibitoren</b>	<b>Antikörper</b>
<b>Medikament</b>	<i>Methylprednisolon</i>	<i>Azathioprin</i>	<i>Cyclosporin A</i>	<i>Sirolimus</i>	<i>Okt3</i>
<b>Wirkung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• lymphotoxisch,</li> <li>• IL-1 Produktion der Makrophagen inhibiert</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• be- einträchtigt DNA Replikation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibiert Calcineurin und blockiert damit die IL2 abhängige T-Zell Proliferation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibiert mTOR mit der Folge von Zellzyklusarrest</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Depletion CD3+ T-Zellen im peripheren Blut</li> </ul>
<b>Medikament</b>		<i>Mycophenolat</i>	<i>Tacrolimus</i>	<i>Everolimus</i>	<i>Basiliximab und Daclizumab</i>
<b>Wirkung</b>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibiert die Purinsynthese</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibiert Calcineurin und blockiert damit die IL2 abhängige T-Zell Proliferation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• inhibiert mTOR mit der Folge von Zellzyklusarrest</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• blockieren IL-2 Rezeptor</li> </ul>

Um maximale immunsuppressive Effekte zu erzielen und gleichermaßen die Toxizität zu minimieren, wird eine Standardimmunsuppression nach Transplantation solider Organe verwendet, die aus einer Kombinationstherapie mit einem Kortikosteroidpräparat, einem Zytostatikum und einem Calcineurin-Inhibitor besteht [29]. Entsprechende Langzeiterfahrungen liegen zur Zelltherapie bei Lebererkrankungen nicht vor. Daher wird klinisch häufig die Kombinationstherapie wie bei der Organtransplantation angewendet.

### 1.1.8 Zelltransplantation bei Lebererkrankungen

Die Zelltransplantation als alternative Option zur Lebertransplantation rückt immer mehr in den klinischen Focus und soll in den nächsten Abschnitten näher betrachtet werden.

### 1.1.9 Hepatozytentransplantation

Die Leberparenchymzelle (Hepatozyt) ist die kleinste funktionelle Einheit der Leber und kann somit alle Stoffwechselprozesse wie die Leber als Ganzes ausführen. Daher stellt die Hepatozytentransplantation als Funktionsersatz eine Alternative zur Lebertransplantation dar. Die Hepatozyten werden aus einem nicht für die Organtransplantation frei gegebenen Spenderorgan durch Kollagenase-Perfusion isoliert und dem Empfänger über die Portalvene (*Vena portae*) in die Leber infundiert. Ein syngenes Tiermodell zur Hepatozytentransplantation wurde bereits 1998 von Laconi beschrieben [30]. Tiere des Empfängerstamms (*F344 Fischer-Ratten*) sind aufgrund einer spontanen Mutation für die Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV bzw. CD26), eine auf der apikalen Seite der Hepatozyten lokalisierte Protease, defizient. Über die Portalvene in die Lebern dieser Tiere transplantierte Hepatozyten eines *F344*-Wildtypstammes lassen sich durch die

enzymatische Hydrolyse des Substrats Gly-Pro-4-methoxy- $\beta$ -Naphthylamid zu Glycyl-Prolin und 4-methoxy- $\beta$ -Naphthylamid nachweisen. Das Diazoniumsalz *Fast Blue* bindet durch eine Diazokopplung an 4-methoxy- $\beta$ -Naphthylamid, welches die DPPIV-positiven Zellen des Spendertieres im negativem Empfängerparenchym rot färbt [31]. Eine effiziente Repopularisierung des Empfängerparenchyms durch Spenderhepatozyten lässt sich nur durch 2 Maßnahmen zur Prä-Konditionierung der Empfängerleber erreichen. 1.) Die Empfängertiere werden mit Retrorsin vorbehandelt. Retrorsin ist ein Pyrrolizidinalkaloid des Jakobs-Greiskrautes (*Senecio jacobaea*) mit hepatotoxischen Eigenschaften [32]. Es inhibiert die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten in der Empfängerleber. 2.) Zum Zeitpunkt der Hepatozytentransplantation wird mit einer partiellen Hepatektomie ein Proliferationsreiz gesetzt. Nur so erhalten die Spenderzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Hepatozyten des Empfängerparenchyms [30]. Weitere Tiermodelle zur Hepatozytentransplantation bei verschiedensten metabolischen Lebererkrankungen wie z.B. *Wilson's disease* [33], Crigler-Najjar Syndrom (Typ1) [34] und Tyrosinämie Typ1 [35] sind in der Literatur beschrieben.

Die erste erfolgreiche klinische Hepatozytentransplantation wurde von Ira Fox und Steve Strom bei einer 12-jährigen Patientin mit Crigler-Najjar-Syndrom durchgeführt [36]. Ein Vorteil der Hepatozytentransplantation gegenüber der Leberorgantransplantation ist, dass die Hepatozyten aus einem Spenderorgan entweder für wiederholte Infusionen bei einem oder auch für mehrere Empfänger genutzt werden können. Weiterhin ist die Hepatozytentransplantation minimal invasiv und mit geringeren immunologischen Komplikationen verbunden. Bereits 1967 wurde das immunologische Phänomen der portalvenösen Akzeptanz von Cantor *et al.* beschrieben [37]. So besteht die Möglichkeit, dass die allogenen Spenderhepatozyten durch die Applikation über die Portalvene immunologisch besser akzeptiert werden und eine, oft mit Nebenwirkungen verbundene, immunsuppressive Behandlung im Anschluss an die Transplantation nicht mehr notwendig ist.

Allerdings konnte sich die Hepatozytentransplantation trotz ihrer langen prä-klinischen erfolgsversprechenden Geschichte bis heute klinisch nicht durchsetzen. Auf Grund des unter 1.1.6 beschriebenen Defizits an Spenderorganen zur Lebertransplantation stehen auch praktisch keine Organe zur Hepatozytenisolierung zur Verfügung. Die Spenderorgane, welche nicht für die Organtransplantation zugeteilt werden, weisen in der Regel massive Schädigungen auf, so dass aus diesen nur geringe Mengen an Hepatozyten in schlechter Qualität zu isolieren sind. Daher wird weiter intensiv nach alternativen

Zellressourcen gesucht. Die Möglichkeit, Hepatozyten *in vitro* aus Stammzellen zu generieren, stellt daher heute eine vielversprechende Alternative zur Isolierung von primären Hepatozyten aus Spenderorganen dar.

#### **1.1.10 Transplantation von mesenchymalen Stammzellen**

Stammzellen lassen sich nach ihrem Differenzierungspotential in totipotente, pluripotente und multipotente Zellen klassifizieren. Als totipotent gelten Eizellen, aus ihnen kann ein kompletter Organismus entstehen. Die embryonale Stammzelle wird als pluripotent klassifiziert und besitzt die Fähigkeit, alle Gewebetypen zu bilden. Das Differenzierungspotential einer adulten Stammzelle ist multipotent, d.h. es können nur noch spezifische Gewebetypen regeneriert werden. Viele adulte Gewebe, darunter das Knochenmark, das Fettgewebe [38] und die Synovialflüssigkeit [39] beherbergen ein Reservoir an adulten Stammzellen zur Erneuerung des Gewebes auf Grund von Alterungsprozessen oder Traumata [40]. Die adulten Stammzellen werden in hämatopoetische Stammzellen (HSC) und in mesenchymale Stammzellen (MSC) unterteilt. Als plastikadhärente Zelle mit fibroblastenartigem Phänotyp und kolonieartigem Wachstum in der Zellkultur wurde die mesenchymale Stammzelle erstmals 1976 durch Friedenstein *et al.* beschrieben [41]. Sie zeichnet sich durch ein charakteristisches Set an Oberflächenmolekülen aus. So sind sie für die hämatopoetischen Marker CD14, CD45 und CD34 negativ und für die mesenchymalen Marker CD44, CD29, CD90, CD71, CD105 und CD166 positiv [42-45]. Weitere wesentliche Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen sind ihre anti-inflammatorische und immunmodulative Wirkung [46-47], sowie ihre antiapoptotische und proliferative Wirkung auf das Leberparenchym [48]. Viele lösliche Faktoren, darunter TGF $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ), HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), PGE<sub>2</sub> (*Prostaglandin E2*) und IDO (*2,3-Dioxygenase*), konnten als mögliche Kandidaten für die immunsuppressive Aktivität von MSC identifiziert werden [49]. Mesenchymale Stammzellen sind aus dem Knochenmark sowie aus dem Fett- und Nabelschnurgewebe leicht und praktisch unbegrenzt verfügbar. Ihre oben beschriebenen Wirkungen und ihr Potential, *in vitro* in verschiedene Gewebetypen differenzieren zu können, bieten vielfältige therapeutische Anwendungsmöglichkeiten, die heute in der Tat klinisch in Form von zahlreichen Phase I-Studien erprobt werden ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Dabei stellte sich heraus, dass sich mesenchymale Stammzellen eher für die klinische Anwendung in Bezug auf Leberzellersatz eignen, als hämatopoetische oder embryonale Stammzellen. Die Gewinnung und Verwendung von embryonalen Stammzellen ist nicht nur ethisch sehr kontrovers diskutiert, auch neigen



diese Zellen zu Teratombildung. Hämatopoetische Stammzellen neigen zur Zellfusion mit dem Empfängerlebergewebe, so dass die funktionelle Rekonstruktion der Empfängerleber nicht oder nur schlecht erfolgt [50-52].

Das *multilineage* Differenzierungspotential von MSC aus verschiedensten tierischen und humanen Geweben, wurde nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* beschrieben [40,53-54].

Die hepato gene Differenzierung von MSC aus Knochenmark, Nabelschnurblut und Fettgewebe unter bestimmten *in vitro* Wachstumsbedingungen, konnte für Ratte und Maus [55-56], sowie für humane MSC [57-63] gezeigt werden. Dabei existiert eine Vielzahl von Protokollen zur hepatozytären Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen. Darunter befinden sich auch mehrstufige Protokolle, welche zuerst eine Behandlung der Zellen mit Wachstumsfaktoren der BMP- oder der Fibroblastenwachstumsfaktor-Familie vorsehen und im Anschluss zur hepatozytären Reifung IL6-Typ-Zytokine wie Onkostatin M vorsehen [59,62,64]. In unserer Arbeitsgruppe wird ein einstufiges Differenzierungsprotokoll verwendet, bei welchem die mesenchymalen Stammzellen mit hepatotropen Wachstumsfaktoren wie EGF (*Epidermal Growth Factor*) und HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) behandelt werden [63,65]. Es gibt aber auch Kombinationen beider Techniken [57]. Nach der Transplantation der hepatozytär differenzierten MSC konnte die funktionelle Langzeitintegration der Zellen ins Wirtsparenchym nachgewiesen werden [65-66]. Für humane „*hepatocyte-like*“ Zellen aus dem Fettgewebe konnte neben der funktionellen Integration auch die Verbesserung eines CCl<sub>4</sub>-induzierten akuten Leberschadens in *Nude* Mäusen belegt werden [64]. Interessanterweise konnte für undifferenzierte MSC gezeigt werden, dass diese über lösliche, parakrine Faktoren wirken [48] und nicht oder nur in sehr geringem Umfang das Wirtsparenchym wie die „*hepatocyte-like*“ Zellen besiedeln. So waren undifferenzierte MSC in der Lage ein durch D-Galactosamin ausgelöstes fulminantes Leberversagen bei der Ratte zu verhindern [67].

Zusammenfassend lassen sich also MSC in Leberzellen differenzieren [68-69]. Die *in vitro* generierten Leberzellen könnten an Stelle von aus Spenderorganen isolierten primären Hepatozyten Anwendung in der klinischen Hepatozytentransplantation finden und somit helfen, das unter 1.1.6 beschriebene Defizit an Spenderorganen auszugleichen.

### 1.1.11 Großtiermodell

Die Leberanatomie der Ratte [70] weicht erheblich von der Leberanatomie des Menschen ab, so werden 7 Leberlappen über einzelne Gefäße separat mit Blut versorgt. Die Leberanatomie des Schweines ist der des Menschen sehr ähnlich, hinsichtlich Aufteilung

und Blutversorgung der einzelnen Leberlappen. Um die Applikation von mesenchymalen Stammzellen als klinische Therapieform bei akuten und chronischen Lebererkrankungen zu etablieren, ist es daher zur besseren Übertragbarkeit auf den Menschen zwingend notwendig, ihre bereits in verschiedenen Kleintiermodellen nachgewiesene Wirksamkeit hinsichtlich anti-apoptotischer und pro-proliferativer Eigenschaften am Großtiermodell zu testen. Die Isolierung und Charakterisierung und vor allem die hepatogene Differenzierung von porcinen MSC ist in der Literatur kaum beschrieben. Diese *in vitro* Vorarbeiten sind zwingend notwendig um ein Großtiermodell der MSC-Transplantation zu etablieren. Die Übertragbarkeit der Kleintierversuche auf das Großtier ist das Bindeglied, welches vom Paul-Ehrlich-Institut gefordert wird, um eine klinische Studie mit hinreichender Sicherheit für den Patienten zu initiieren und somit die MSC-Applikation als Therapieform im klinischen Alltag bei akuten und chronischen Leberversagen zu etablieren.

## 2 Zentrale Fragestellungen der Arbeit

Zur Klärung der zukünftigen klinischen Tauglichkeit von Hepatozyten- oder MSC-Transplantation sollten drei wesentliche Fragestellungen, nämlich zum immunologischen Verhalten, zur Wirksamkeit bei akuten und chronischen Leberschädigungen und zur Machbarkeit im dem Menschen möglichst nahen Großtiermodell geklärt werden.

(1.) Erzeugt die portalvenöse Applikation von allogenen Hepatozyten im Rattenmodell immunologische Toleranz oder kommt es zur Abstoßung der allogenen Hepatozyten?

Welche ist die effektivste immunsuppressive Strategie bei eventuell auftretenden Abstoßungsreaktionen nach Hepatozytentransplantation?

(2.) Nach Etablierung von akuten und chronischen Leberschädigungsmodellen in der Ratte und der Maus sollten differenzierte mesenchymale Stammzellen als Ersatz für die Hepatozytentransplantation systemisch appliziert werden. Es stellt sich die Frage, ob die systemisch applizierten Zellen in die akut bzw. chronisch geschädigten Leberbereiche migrieren und ins Parenchym integrieren? Wie wirken die Stammzellen sich auf das geschädigte Gewebe aus?

(3.) Lassen sich porcine mesenchymale Stammzellen aus Fettgewebe und Knochenmark isolieren und hepatogen differenzieren? Durch die funktionelle Charakterisierung nach der Differenzierung sollte die geeignete Stammzellquelle für ein präklinisches Großtiermodell zum Leberversagen nach ausgedehnter Teilresektion identifiziert werden

### 3 Material und Methoden

Die in der Arbeit verwendeten Materialien und Geräte werden nicht gesondert, sondern bei ihrer Verwendung zu den beschriebenen Methoden aufgeführt.

#### 3.1 Zellkulturarbeiten

##### 3.1.1 Zellisolierung

###### 3.1.1.1 Hepatozytenisolierung aus der Ratte

Als Hepatozytenspender wurden 6-8 Wochen alte, 200-250g schwere *F344-Fischer* Ratten (syngenes Modell) oder *Dark Agouti* Ratten (allogenes Modell) verwendet. Die Isolierung der Spenderhepatozyten erfolgte durch eine modifizierte 2-Schritte-Kollagenase-Perfusion der Leber nach Seglen *et al.* [71]. Alle verwendeten Medien wurden vor Gebrauch steril filtriert (0,2µm). Dabei wurden die Sinusoide der Leber zunächst mit einem Prä-Perfusionspuffer (PPP: 120 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 24,4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,25 mM EGTA; pH 7,35; mit Carbogen begast) blutleer gespült und durch Komplexierung zweiwertiger Ionen (EGTA) die Zell-Zell-Verbindungen gelockert. Im zweiten Schritt wurden die Hepatozyten durch die Perfusion mit dem kollagenasehaltigen Perfusionspuffer (CPP: 120 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 24,4 mM NaHCO<sub>3</sub>; 15 mM HEPES; 4 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,35; mit Carbogen begast; 0,12U/ml Kollagenase (NB4G von Serva, Heidelberg)) aus dem Bindegewebsgerüst der Leber gelöst.

Die Einleitung der Narkose der Spendertiere erfolgte durch intraperitoneale (i.p.) Injektion von 700 µl je kg Körpergewicht Phentobarbital-Natrium (Narcoren<sup>®</sup> (Merial GmbH, Hallbergmoos)). Nach Applikation (i.p.) von 1 ml Heparin (Heparin-Natrium 25000 I.E./5ml (Ratiopharm GmbH, Ulm)) je kg Körpergewicht wurde das Spendertier auf dem OP-Tisch fixiert. Nach Desinfektion des OP-Feldes mit Ethanol (70 %) erfolgte die Eröffnung der Abdominalhöhle entlang der *Linea alba* bis zum *Sternum*. Sowohl der Magen als auch die Darmschlingen wurden nach rechts exponiert und die nun freiliegende *Vena portae* wurde lose ligiert (3-0, PET Faden, geflochten, beschichtet (Catgut GmbH, Markneukirchen)) und mit einer Venenverweilkanüle (Opriva<sup>®</sup> 22G (Smiths Medical, Lancashire, UK)) punktiert. Durch das Zuziehen der Ligatur wurde die Kanüle fest eingebunden und über einen Adapter der erste Prä-Perfusionspuffer (PPP) eingeleitet. Sofort wurde die *Vena cava inferior* punktiert, wodurch das Abfließen des Blutes und des

Puffers aus dem Gefäßsystem ermöglicht wurde. Die Perfusion erfolgte mit einer Flussrate von 20-25 ml/min. Nach 8-10 Minuten wurde der kollagenasehaltige Perfusionspuffer (CPP) eingeleitet und die Perfusion so lange fortgesetzt, bis durch den Kollagenaseverdau Desintegrationsfelder auf der Leber zu erkennen waren. Nach der Hepatektomie erfolgte die weitere Aufarbeitung der Hepatozyten unter sterilen Bedingungen und ständiger Kühlung.

Im Waschpuffer (20 mM HEPES; 120 mM NaCl; 4,8 mM KCl; 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4% BSA; 0,005% DNase) wurde die *Capsula fibrosa* mit einer Kanüle (25G (BD, Heidelberg)) eröffnet und die Leber am Zwerchfellansatz mit einer Pinzette gefasst. Durch vorsichtiges Schwenken lösten sich die Hepatozyten sowie die Nichtparenchymzellen (NPCs) aus der Leberkapsel. Nach Filtration der Zellsuspension durch eine sterile Mullkompressen (10x10 cm (Fuhrmann GmbH, Much)) wurden die Hepatozyten (Pellet) von den NPCs (Überstand) durch 5-minütige Zentrifugation (75 x g) separiert. Die so isolierten Spenderhepatozyten wurden noch zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und nach Bestimmung von Zellzahl und Vitalität zur Transplantation aliquotiert. Dazu wurden jeweils  $7,5 \times 10^6$  vitale Hepatozyten in 500 µl PBS (Biochrom AG, Berlin) aufgenommen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Haemocytometers (Fuchs-Rosenthal (Roth, Karlsruhe)). Die Vitalitätsfärbung wurde mit Trypanblau (0,4 % Trypan Blue solution (Sigma-Aldrich GmbH, München)) durchgeführt.

### 3.1.1.2 Hepatozytenisolierung aus dem Schwein

Zur Isolierung primärer porciner Hepatozyten wurden Tiere der urologischen Endoskopiekurse des Medizinisch Experimentellen Zentrums der Universität Leipzig (MEZ) verwendet. Zur Prämedikation der Schweine (deutsche Landrasse, weiblich, 20-30 kg) wurde Ketamin (15 mg/kgKG), Atropin (0,01 mg/kgKG) sowie Midazolam (0,5 mg/kgKG) intramuskulär appliziert. Nach Intubation der Tiere erfolgte die weitere Inhalationsnarkose mit 1,5 Vol-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim). Vor der Leberentnahme wurde das Versuchstier durch Applikation von 25.000 I.E. (Heparin-Natrium, Ratiopharm GmbH, Ulm) heparinisiert. Im Anschluss erfolgte die Euthanasie der Tiere durch eine i.v. Bolusinjektion von 2 g Thiopental und 50 ml 1 M KCl Lösung. Unmittelbar nach Herzstillstand wurde der Bauchraum eröffnet und die komplette Leber entnommen. Der *Lobus caudatus* wurde abgetrennt, ein Lebergefäß mit einer Glasolive kanüliert. Das Resektat wurde unter Verwendung einer Peristaltikpumpe (ISM834, IDEX Health and Science, Wertheim-Mondfeld) mit einer

Flussrate von 28 ml/min mit eiskaltem Leibovitz's L-15 Medium (PAA Laboratories GmbH, Cölbe) blutfrei gespült. Der *Lobus caudatus* wurde in ein steriles Gefäß gegeben und auf Eis ins Labor verbracht, wo die weitere Isolierung der Hepatozyten im Wasserbad (37 °C) erfolgte.

Das Resektat wurde mit einer Flussrate von 28 ml/min für 50 min mit Puffer 1 (142 mM NaCl; 6,7 mM KCl; 10 mM Hepes; 1 mM Glucose; 1 mM EGTA; pH 7,35; mit Carbogen begast) und anschließend für zirka 50 min mit Puffer 2 (Hepes 25 mM; 123 mM NaCl; 6,7 mM KCl; 6,7 mM CaCl<sub>2</sub>; Glucose 5 mM; pH 7,35; mit Carbogen begast; 142,8U/ml Kollagenase (Typ I von Worthington Biochemical Corporation, USA) perfundiert. Der *Lobus caudatus* wurde durch die Perfusion mit Puffer 2 unvollständig verdaut und deshalb mit einer Schere aufgeschnitten. Die durch den Verdau mobilisierten Hepatozyten wurden in einem Becherglas mit eiskaltem Waschpuffer (siehe 3.1.1.1) aus der Leberkapsel geschüttelt. Alle weiteren Schritte zur Hepatozytenisolation erfolgten wie unter 3.1.1.1 beschrieben.

### 3.1.1.3 Isolierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe der Ratte

Als Spender von mesenchymalen Stammzellen (rMSC) wurden 12-24 Wochen alte, 300-350 g schwere *F344-Fischer* Ratten verwendet. Nach Einleitung der Narkose, Fixierung des Spendertieres auf dem OP-Tisch und Desinfektion des OP-Feldes mit Ethanol (70 %) erfolgte die Eröffnung der Abdominalhöhle entlang der *Linea alba*. Das peritoneale Fettgewebe wurde entnommen und in 20 ml Zellkulturmedium (DMEM-HG (PAA Laboratories GmbH, Cölbe)) überführt. Das Fettgewebe wurde mechanisch zerkleinert und die Gewebesuspension mit 0,2 Units/ml Kollagenase (NB4G Serva, Heidelberg) supplementiert. Das Gewebe wurde für 25-30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml inaktiviertem fetalen Kälberserum (FKS (GIBCO®-invitrogen™-Life Technologies GmbH, Darmstadt)) wurde das nun verdaute Gewebe über ein Nylonnetz (Maschengöße: 80µm (Th. Geyer GmbH, Berlin)) filtriert und anschließend für 7 min bei 4 °C und 200 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde 2-mal mit PBS gewaschen und anschließend auf einen Dichtegradienten (Biocoll, ρ=1,077 g/ml (Biochrom AG, Berlin)) geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte ohne Bremse bei 4 °C und 250 x g für 20 min. Die Fraktion der mononukleären Zellen, welche sich in der Interphase des Gradienten befand, wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und 2-mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Aussaat der Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> (TPP®, Trasadingen Schweiz)) in EM6F Medium (Zusammensetzung siehe

3.1.2.1). Die mesenchymalen Stammzellen adhäreren im Gegensatz zu anderen in der mononukleären Zellfraktion enthaltenen Zellen am Boden der Zellkulturflasche. 24 h nach der Aussaat erfolgte der erste Medienwechsel und wurde im folgenden Kulturverlauf alle 4-5 Tage wiederholt, wodurch alle nicht-adhärenen, flottierenden Zellen entfernt und mesenchymale Stammzellen nahezu in Reinkultur angereichert wurden. Bei einer Konfluenz von 90 % erfolgte die Analyse der MSC (siehe 3.1.3.1) mittels Durchflusszytometrie. Nach anschließender Kryokonservierung mit inaktiviertem FKS unter Zusatz von 7,5 % DMSO (Roth, Karlsruhe) verblieben die Zellen in flüssigem Stickstoff bis zum Versuch.

#### **3.1.1.4 Isolierung humaner MSC aus dem Knochenmark**

Die Isolierung humaner MSC aus dem Knochenmark erfolgte auf die gleiche Weise. Die Entnahme des Knochenmarks aus dem *Femur* erfolgte während der Implantation eines künstlichen Hüft- bzw. Kniegelenkes in der Klinik und Poliklinik für Orthopädie am Universitätsklinikum Halle. Die Zustimmung der Patienten für diese Entnahme und das Einverständnis der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität lagen vor. Das Knochenmark wurde in einer Citrat-Monovette<sup>®</sup> (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gesammelt und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

#### **3.1.1.5 Isolierung porciner MSC aus dem Fettgewebe und Knochenmark**

Fettgewebe sowie Knochenmark aus dem *Femur* adulter Landrasseschweine wurden von Dr. med. A. Reske aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie des Universitätsklinikums Leipzig im Rahmen eines Forschungsvorhabens der Gruppe zur Verfügung gestellt. Isoliert wurden die porcinen MSC wie unter 3.1.1.3 beschrieben.

### **3.1.2 Zellkultivierung**

#### **3.1.2.1 MSC**

Nach Isolierung und Charakterisierung wurden die MSC auf mit Fibronectin (Sigma-Aldrich GmbH, München) beschichteten Zellkulturplatten (60,1 cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup>, Trasadingen, Schweiz)) in einer Dichte von 200-400 Zellen je cm<sup>2</sup> im Erhaltungskulturmedium EM6F ausplattiert (60 % D-MEM (Biochrom AG, Berlin); 40 % MCDB201 (Sigma-Aldrich GmbH, München), 42 mM Natriumhydrogencarbonat; 0,1 mM Ascorbinsäure; 1 nM Dexamethason; 37,8 nM Selensäure; 16,75 µM Linolsäure; 860 nM Insulin; 62,5 mM Transferrin; 15 % inaktiviertes FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin; pH 7,2). Die Kultivierung in EM6F erfolgte bis zu einer Konfluenz von 90 %. Dann wurden die bis dahin als undifferenziert geltenden MSC geerntet oder weiter zur Differenzierung in verschiedene Zelltypen kultiviert (siehe 3.1.4).

### **3.1.2.2 Porcine Hepatozyten**

Nach Isolierung der primären porcinen Hepatozyten wurden diese auf mit Kollagen beschichteten Zellkulturplatten (TPP®, Trasadingen, Schweiz) in einer Dichte von 124.000 Zellen je cm<sup>2</sup> in Williams Medium E supplementiert mit 2,5 % FKS (AppliChem GmbH, Darmstadt) ausplattiert. Nach 2 Stunden Inkubationszeit, in denen die vitalen Hepatozyten auf der Zellkulturschale haften, erfolgte ein weiterer Medienwechsel mit dem Erhaltungsmedium Williams E (supplementiert mit 0,2 nM HGF; 3,3 nM EGF; 1 % Penicillin/Streptomycin). Im weiteren Kulturverlauf erfolgte der Medienwechsel im 2-tägigen Turnus.

### **3.1.3 Durchflusszytometrische Analysen**

#### **3.1.3.1 Charakterisierung der auf MSC spezifisch exprimierten Oberflächenmoleküle**

Zur Charakterisierung der Oberflächenmoleküle CD29, CD44 und CD45 wurden die MSC nach der Isolierung bis zu einer Konfluenz von 90 % in EM6F kultiviert und schließlich mit Trypsin-EDTA (c.c.pro GmbH, Oberdorla) für 5 min bei 37 °C von der Zellkulturschale gelöst. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal in FACS-Puffer (1 % inaktiviertes FKS in PBS) gewaschen. Jeweils 200.000 Zellen wurden in speziell für FACS-Analysen ausgelegte Röhrchen (Falcon™ (BD, Heidelberg)) überführt und mit den spezifischen Antikörpern (siehe. Tab. 3) sowie einer Isotypkontrolle (Simultest™ Control (BD, Heidelberg)) in einer Verdünnung von 1:20 für 30 min bei Raumtemperatur (RT) schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit FACS-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die so vorbereiteten Zellen wurden an das IZKF Leipzig zur durchflusszytometrischen Analyse weitergegeben (LSR II (BD, Heidelberg)). Der prozentuale Anteil der für das respektive Antigen positiven Zellen wurde mittels einer Software ausgewertet (Software: FACS Diva v.6.1.3 (BD, Heidelberg)).



**Tab. 3.** FACS-Antikörper

<i>Antigen</i>	<i>Speziesspezifität</i>	<i>Wirt</i>	<i>Markierung</i>	<i>Hersteller</i>
<b>CD29</b>	Ratte	Hamster	FITC	BD, Heidelberg
<b>CD44</b>	Ratte	Maus	FITC	BD, Heidelberg
<b>CD45</b>	Ratte	Maus	PE	BD, Heidelberg
<b>CD14</b>	Schwein	Maus	FITC	antikoeper online
<b>CD45</b>	Schwein	Maus	PE	Pierce, Bonn,
<b>CD44</b>	Schwein	Ratte	FITC	Abcam, Cambridge, UK
<b>CD90</b>	Human/Schwein	Maus	FITC	BD, Heidelberg
<b>CD105</b>	Schwein	Maus	FITC	Abcam, Cambridge, UK
<b>CD29</b>	Schwein	Maus	FITC	BD, Heidelberg

### 3.1.3.2 Quantifizierung der Repopularisierung des Empfängerleberparenchyms durch Spenderhepatozyten

Zur Bestimmung der Repopularisierungsrate des Empfängerleberparenchyms durch Spenderhepatozyten wurden die Hepatozyten aus der Empfängerleber an Tag 5 bzw. 3 Wochen nach der Transplantation isoliert (siehe 3.1.1.1). Nach der Isolierung wurden die Hepatozyten zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen und jeweils 200.000 Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Zur Detektion der Spenderhepatozyten wurden die Zellen mit einem für CD26 (PE *mouse anti-rat* CD26 von BD Pharmingen<sup>TM</sup>, Heidelberg) spezifischen Antikörper in einer Verdünnung von 1:75 für 30 min bei RT schüttelnd inkubiert. Ebenso wurde auch eine Isotypkontrolle mitgeführt. Im Anschluss wurden die Zellen 3-mal mit FACS-Puffer gewaschen und in 500 µl des gleichen Puffers aufgenommen. Die so vorbereiteten Hepatozyten wurden durchflusszytometrisch vermessen (FACSCalibur<sup>TM</sup> (BD, Heidelberg)) und der prozentuale Anteil (Software: WinMDI 2.9) CD26-positiver Hepatozyten in der Gesamtzellfraktion bestimmt.

### 3.1.4 Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

#### 3.1.4.1 Adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung wurden die MSC bis zu einer Konfluenz von 90 % in EM6F kultiviert (siehe 3.1.2.1). 24 h nach Zugabe von 25 µM Azacytidin (Sigma-Aldrich GmbH, München) erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in ADM (DMEM; 50 µM Dexamethason; 1,72 mM Insulin; 100 µM Indomethacin; 500 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin; 5 µM Rosiglitazon; 10 % inaktiviertes FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin).

### 3.1.4.2 Osteogene Differenzierung

Zur osteogenen Differenzierung wurden die MSC bis zu einer Konfluenz von 90 % in EM6F kultiviert (siehe 3.1.2.1). 24 h nach Zugabe von 25  $\mu$ M Azacytidin erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in ODM (DMEM; 1  $\mu$ M Dexamethason; 200  $\mu$ M Ascorbinsäure; 10 mM Glycerin-2-phosphate; 10 % inaktiviertes FKS; 1% Penicillin/Streptomycin)

### 3.1.4.3 Hepatogene Differenzierung

Zur hepatoenen Differenzierung wurden die MSC bis zu einer Konfluenz von 90 % in EM6F kultiviert (siehe 3.1.2.1). 24 h nach Zugabe von 25  $\mu$ M Azacytidin erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen in HGM (DMEM; 0,1  $\mu$ M Dexamethason; 11,1 mM Galaktose; 0,6 mM Ornithin; 0,26 mM Prolin; 9,98 mM HEPES; 2,5 mM Nicotinamid; 0,99 mM Glutamin; 0,39  $\mu$ M Zinkchlorid; 0,46  $\mu$ M Zinksulfat; 0,12  $\mu$ M Kupfersulfat; 0,16  $\mu$ M Mangansulfat; 0,2 nM HGF; 3,3 nM EGF; 0,2 % Albumin; 0,00019 % ITS; 2,5 % inaktiviertes FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin). Für die hepatoene Differenzierung der humanen MSC aus dem Knochenmark wurde statt HGM HHMM verwendet (50 % HGM (siehe oben)) und 50 % MEM (von PAA Laboratories GmbH, Cölbe); 50 nM Dexamethason; 5,55 mM Galaktose; 0,3 mM Ornithin; 0,13 mM Prolin; 4,99 mM HEPES; 1,25 mM Nicotinamid; 0,5 mM Glutamin; 0,195  $\mu$ M Zinkchlorid; 0,23  $\mu$ M Zinksulfat; 0,06  $\mu$ M Kupfersulfat; 0,08  $\mu$ M Mangansulfat; 0,2 nM HGF; 3,3 nM EGF; 0,1 % Albumin; 0,00005 % ITS; 430 nM Insulin ; 2,5 % inaktiviertes FKS; 0,05 % Gentamycin und 0,5 % Penicillin/Streptomycin)

## 3.1.5 Funktionsassays

### 3.1.5.1 Cytochrom P 450-Aktivität

Cytochrome der P450-Familie (CYP) gehören zu den Hämproteinen und kommen hauptsächlich in der Leber vor, wo sie eine zentrale Rolle bei der Biotransformation von Arzneimitteln spielen.

#### 3.1.5.1.1 Enzymaktivität des CYP1A1 (EROD=Ethoxyresorufin-O-deethylase)

Ethoxyresorufin wird vom Cytochrom CYP1A1 durch oxidative Dealkylierung zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Diese Fluoreszenz kann am Fluoreszenzphotometer vermessen werden (544nm, 590nm) und dient als Maß für die Enzymaktivität bezogen auf pmol/10.000 Zellen x h. Zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität des CYP1A1 wurde sowohl 3,3'-Methylene-bis(4-hydroxycoumarin) (Dicumerol, Sigma-Aldrich, Steinheim) als auch O<sup>7</sup>-Ethoxyresorufin (Resorufinethylether, Sigma-Aldrich, Steinheim) in einer finalen Konzentration von je 10  $\mu$ M zur Zellkultur zugesetzt. Nach 2-stündiger

Inkubation der Zellkulturplatte bei 37°C, wurden 75µl des Überstandes entnommen und mit 25 µl Enzymgemisch (167 Teile 10,1M Natriumacetatpuffer pH 4,5: 1 Teil β-Glucuronidase/Acrylsulfase Lösung (Merk, Darmstadt) versetzt und für 2 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Durch Zugabe von 2 Teilen Ethanol (96 %) erfolgte das Abstoppen der Enzymreaktion. Nach Durchmischen der Probe wurde diese bei 4°C und 1500 x g zentrifugiert und der Überstand in einer schwarzen 96-well Platte im Doppelansatz fotometrisch vermessen (590 nm). Die Aktivität des CYP1A1 wurde mit Hilfe einer Resorufin-Standardreihe (0-2µM) ermittelt und auf 10.000 Zellen je Stunde bezogen (pmol/10.000 Zellen x h).

#### **3.1.5.1.2 Enzymaktivität des CYP2B1 (PROD=Pentoxyresorufin-O-deethylase)**

Das Cytochrom CYP2B1 hingegen metabolisiert nicht Ethoxyresorufin sondern Pentylresorufin. Deshalb wurde zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des CYP2B1 das unter 3.1.5.1.1 beschriebene Protokoll verwendet, als Substrat aber wurde zur Zellkultur O<sup>7</sup>-Pentylresorufin (Resorufinpentylether, Sigma-Aldrich, Steinheim) anstatt des O<sup>7</sup>-Ethoxyresorufin zugesetzt.

#### **3.1.5.2 Harnstoffsynthese**

Die Harnstoffsynthese als funktionelles Merkmal von Hepatozyten findet im periportalen Bereich der Leber statt, wobei alle Stickstoffverbindungen wie zum Beispiel Ammoniak im Harnstoffzyklus detoxifiziert werden und letztlich als Harnstoff mit dem Urin über die Niere ausgeschieden wird. Die Bestimmung der Harnstoffsyntheserate der kultivierten Zellen erfolgte im Überstand des Kulturmediums nach einer Methode von Crocker *et. al* [72]. Dabei reagiert Diacetylmonoxim mit Harnstoff zu Hydroxylamin und bildet einen roten Farbstoff, welcher direkt proportional zur Harnstoffkonzentration ist. Die Farbstoffmenge, die der Harnstoffmenge proportional ist, wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm vermessen und auf 10.000 Zellen je 24 h Kulturzeit bezogen mit Hilfe einer Harnstoffstandardreihe (0-6,25 µg/ml) berechnet. Dazu wurden 40 µl des Kulturüberstandes mit 1,25 ml Reaktionslösung bei 95 °C für 10 min schüttelnd inkubiert. Vor der Messung wurden die Proben für 10 min auf Eis abgekühlt.

Die Reaktionslösung bestand zu gleichen Teilen aus *Mixed Acid reagent* (20 %-iger Schwefelsäure und 44,3 µM Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat gelöst in 40 %-iger ortho-Phosphorsäure), *Mixed Colour reagent* (2 % Diacetylmonoxim) und ddH<sub>2</sub>O.

## 3.2 Molekularbiologische Arbeiten

### 3.2.1 RNA Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wurden 750 µl QIAzol<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden) auf die Zellkulturplatte (60,1 cm<sup>2</sup> (TPP<sup>®</sup>, Trasadingen Schweiz)) gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber (TPP<sup>®</sup>, Trasadingen Schweiz) von der Platte gelöst und schließlich in QIAzol<sup>®</sup> resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Chloroform (Merck, Darmstadt) und ausreichender Durchmischung, wurde die Probe für 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 11.500 x g wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol für 30 min bei -20 °C gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C für 10 min und 11.500 x g wurde das RNA-Pellet zwei Mal mit Ethanol (70 %) gewaschen, an der Luft getrocknet und schließlich in 30-50 µl DEPC-Wasser (Roth, Karlsruhe) aufgenommen.

### 3.2.2 cDNA-Synthese

Um eventuelle Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA zu vermeiden wurde vor der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurde pro µg RNA 1 Unit DNase (RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Mannheim)) eingesetzt und für 30 min bei 37 °C verdaut. Danach wurde die DNase durch Zugabe von 1 µl Stopp-Lösung (RQ1 DNase *Stopp Solution* (Promega, Mannheim)) bei 65 °C für 10 min inaktiviert. Im Anschluss wurden 2 µg RNA mit dem *First Strand* cDNA Synthese Kit (Revert-Aid<sup>TM</sup>Premium (Fermentas, St. Leon-Rot)) nach Herstellerangaben umgeschrieben und die entstandene cDNA in der PCR eingesetzt.

### 3.2.3 PCR

Für einen PCR-Ansatz von 20 µl wurden 2 µl 10 x *Taq* Puffer mit 1,3 µl dNTP Mix (10 mM), 0,2 µl *Taq* DNA-Polymerase (rekombinant, 5 Units je µl) (alles Fermentas, St. Leon-Rot) sowie jeweils 1,3 µl *forward* und *reverse* Primer, 3 µl cDNA (s.3.2.2) und 10,9 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einer initialen Denaturierungsphase von 4 min bei 95 °C erfolgte eine Denaturierungsphase von 30 s bei 95 °C. Die *Annealing*-Phase für die Primer betrug 40 s, die anschließende Synthesephase erfolgte für 1.30 min bei 72 °C und die Nachsynthese bei 72 °C für 5 min. Es wurden maximal 36 Zyklen durchlaufen. Die verwendeten Primer und deren PCR-Spezifika sind in Tabelle 4. angegeben.

**Tab. 4.** Primer und PCR Bedingungen

Primer	Sequenz 5' → 3'	Annealing Temperatur in °C	Elongationszeit in s	Größe des PCR- Produktes in bp
<i>LPL_fwd</i>	ATGGAGAGCAAAGCCCTGCTC	63	45	350
<i>LPL_rev</i>	CTGGATAATGTTGCTGGGCC			
<i>ON_fwd</i>	ATGAGGGCCTGGATCTTCTTCTC	63	45	320
<i>ON_rev</i>	CAAAGAAGTGGCAGGAAGAGTCGA			
<i>Transferrin_fwd</i>	GTGGCCTTTGTCAAGCA	52	45	565
<i>Transferrin_rev</i>	CTCCATCCAAGCTCATG			
<i>Albumin_fwd</i>	AAACGCCGTTCTGGTTCGATAC	60	45	400
<i>Albumin_rev</i>	GGGCTTGTGTTCCACCAGCTC			
<i>CD26_fwd</i>	ATAGTAGCTAGCTTTGATGGCA	53	45	398
<i>CD26_rev</i>	CAGCTCTGCTCATGACTGTTG			
<i>AFP_fwd</i>	CCTGACAGGGAAGATGGTGAGC	59	45	400
<i>AFP_rev</i>	GCACTTCTCCAAGAGGCCAGAG			
<i>Cyclophilin_fwd</i>	GCTGATGGCGAGCCCTTGGGTC	57	30	188
<i>Cyclophilin_rev</i>	ACCGATGCCATTATGGCGTGTG			

### 3.3 Histologische und Immunhistologische Arbeiten

#### 3.3.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Kryokonservierte Leberproben wurden mit einem Kryostaten (SLEE Technik GmbH, Mainz) in 5 µm dicke Schnitte aufgearbeitet und auf silanisierte (Silan (Sigma-Aldrich GmbH, München)) Objektträger (Roth, Karlsruhe) aufgebracht. Die Objektträger konnten bis zur weiteren Färbung bei -80 °C aufbewahrt werden. In Vorbereitung auf Färbungen am Kryoschnitt wurden die Leberschnitte auf dem Objektträger bei -20 °C in Aceton für 5 min fixiert und im Anschluss für 5 min in Ethanol (96 %) gewaschen.

Nach Abschluss der jeweiligen Färbungen der Kryoschnitte wurden die Präparate mit Glyceringelatine (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt und mikroskopisch (Primo Vert (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen)) ausgewertet.

#### 3.3.2 Anfertigung von Paraffinschnitten

Nach Entnahme des Lebergewebes wurde dieses für 24 h bei 4 °C in Formalin (4 % Roti® Histofix (Roth, Karlsruhe)) fixiert, anschließend in Paraffinblöckchen eingebettet und mit einem Mikrotom (Microm HM 325 (Thermo Scientific GmbH, Schwerte)) in 1 µm dicken Schnitten auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Die Objektträger konnten bis zur weiteren Färbung ungekühlt aufbewahrt werden.

In Vorbereitung auf Färbungen am Paraffinschnitt wurde das Lebergewebe zunächst wieder entparaffiniert. Dazu wurden die Schnitte für jeweils 2 min in folgende Bäder der

absteigenden Alkoholreihe getaucht: Xylol I, Xylol II, Ethanol (96 %) I, Ethanol (96 %) II, Ethanol (80 %), Ethanol (70 %), Ethanol (50 %) und ddH<sub>2</sub>O.

Zur immunhistochemischen Detektion spezifischer Proteine am Paraffinschnitt erfolgte nach der Entparaffinierung die Demaskierung der Proteine. Dazu wurden die Schnitte für 45 min in Demaskierungspuffer im Dampfkochtopf inkubiert. Der Demaskierungspuffer (pH 6,0) bestehend aus 4,5 ml Zitronensäure (100 mM (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)), 20,5 ml Natriumcitrat (10 mM (Merck Millipore GmbH, Schwalbach)) und 245 ml ddH<sub>2</sub>O wurde kurz vor Gebrauch frisch hergestellt.

Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte zum Eindecken wieder entwässert und verblieben dazu nur ganz kurz in folgenden Bädern der aufsteigenden Alkoholreihe: ddH<sub>2</sub>O, Ethanol (50 %), Ethanol (70 %), Ethanol (80 %), Ethanol (96 %) I, Ethanol (96 %) II, dann für je 2 min in Isopropanol, Xylol I und Xylol II. Im Anschluss wurden die Präparate mit Entellan (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt und mikroskopisch dokumentiert.

### **3.3.3 Zyto- und Histochemie**

#### **3.3.3.1 CD26-Nachweis an Kryoschnitten**

Der enzymatische Nachweis von CD26 wurde an Kryoschnitten durchgeführt. Die Fixierung des Lebergewebes auf dem Objektträger erfolgte wie unter 3.3.1 beschrieben. Nach dem Lufttrocknen der Schnitte wurden diese mit Substratlösung für 20 min bei RT inkubiert. Zur Herstellung der Substratlösung wurden 0,5 mg Gly-pro-methoxy- $\beta$ -naphthylamid (Sigma-Aldrich GmbH, München), 1 mg *Fast Blue* (Sigma-Aldrich GmbH, München) und 5,8 mg NaCl (Roth, Karlsruhe) in 1 ml 100 mM Tris-Maleat-Puffer pH 6,5 (Sigma-Aldrich GmbH, München) eingewogen und gut gemischt. Das membranständige Enzym CD26 setzt das Substrat zu einem unlöslichen roten Farbkomplex um, welcher nicht diffundieren kann. Nach der Reaktion wurden die Schnitte für 5 min in PBS gewaschen, anschließend zur Kernfärbung 40 s in Hämalaun (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) inkubiert und für 5 min in Leitungswasser gebläut. Nach 10-minütiger Fixierung in 10 % Formalin wurden die Präparate wie unter 3.3.1 beschrieben eingedeckt und analysiert.

### 3.3.3.2 PAS-Nachweis von Glykogen in kultivierten Zellen

Nach 21 Tagen Differenzierung wurde die Einlagerung von Glykogen in den hepatogen differenzierten MSC mittels PAS (*Periodic Acid Schiff*)-Reaktion nachgewiesen. Dabei katalysiert die Periodsäure die Oxidation von Glykolen zu Aldehydgruppen. Diese binden die fuchsinschwefelige Säure des Schiffschens-Reagenz. Das entstehende Chromogen besitzt eine magenta-rote Farbe.

Die Zellen wurden auf der Kulturschale mit einem 1:1 Methanol/Aceton-Gemisch bei -20 °C für 5 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf der Kulturschale zwei Mal mit ddH<sub>2</sub>O gespült und für 10 min mit 1 % Periodsäure (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Nach zweimaligem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte nun die Inkubation mit Schiffschens-Reagenz (Roth, Karlsruhe) für 15 min. Nach erneutem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O wurde die Färbung mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

### 3.3.3.3 Nachweis von Lipiden in kultivierten Zellen mit Sudan III

Nach 8 Tagen Differenzierung wurden Lipideinlagerungen in den adipogen differenzierten MSC mittels einer Sudan-III-Färbung nachgewiesen.

Dazu wurden die Zellen auf der Kulturschale mit PBS gespült. Im Anschluss wurde eine filtrierte Sudan III-Lösung (Roth, Karlsruhe) für 20 min auf die Zellen gegeben. Nach erneutem Spülen mit PBS wurde die orangene Färbung der Lipidtröpfchen mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

### 3.3.3.4 Nachweis der alkalischen Phosphatase mit BCIP in der Zellkultur

Nach 8 Tagen Differenzierung wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase in den osteogen differenzierten MSC durch die Inkubation mit dem Substrat BCIP nachgewiesen. Dabei spaltet die alkalische Phosphatase enzymatisch die Phosphatgruppe ab, wodurch ein Chromogen mit blauer Farbe entsteht.

Dazu wurden die Zellen auf der Kulturschale in einem 1:1 Methanol/Aceton Gemisch bei -20 °C für 5 min fixiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf der Kulturschale zwei Mal mit ddH<sub>2</sub>O gespült und für 10 min mit BCIP-Lösung (BCIP®/NBT *solution* (Sigma-Aldrich GmbH, München)) inkubiert. Nach erneutem Spülen mit ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Analyse und Dokumentation der Färbung am Mikroskop.

### 3.3.3.5 HE-Färbung an Paraffinschnitten

Nach der Vorbereitung der Paraffinschnitte wie unter 3.3.2 beschrieben wurden die Schnitte für 30 s in Hämalaun inkubiert und anschließend 5 min in Leitungswasser gebläut. Nach dem Bläuen erfolgte die Inkubation der Schnitte für 5 min mit Eosin (Merck

Millipore GmbH, Schwalbach). Die Schnitte wurden entwässert (siehe 3.3.2) und mit Entellan eingedeckt.

### **3.3.3.6 Sirius red-Färbung an Paraffinschnitten**

Sirius red färbt die Bindegewebsfasern (Kollagen) im Leberparenchym rot an. Nach der Vorbereitung der Paraffinschnitte wie unter 3.3.2 beschrieben wurden die Schnitte 60 min in einer Sirius Red-Lösung inkubiert. Zur Herstellung der Sirius Red-Lösung wurden 0,1 g Direct red 80 (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe) in 100 ml wässriger 1,2 %-iger Pikrinsäure (AppliChem-BioChemica, Darmstadt) vollständig gelöst. Im Anschluss wurden die Schnitte mit 0,5 %-iger Essigsäure (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) gewaschen, wie unter 3.3.2 entwässert und eingedeckt. Mit Hilfe von ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Maryland USA) wurde die Rotfärbung im Leberschnitt quantitativ erfasst und der Anteil an Kollagenfasern im Leberparenchym in Pixel Kollagen/Pixel gesamt bestimmt.

## **3.3.4 Immunzyto- und histochemie**

### **3.3.4.1 Nachweis von Kupfferzellen mittels anti-His-36 Färbung in isolierten NPCs**

Isolierte NPCs (siehe 3.1.1.1) wurden auf Deckgläschen in 12 well-Zellkulturplatten ausgesät und in HGM ohne HGF (Zusammensetzung siehe 3.1.4.3) kultiviert. 24 h nach Einsaat wurden die Kupfferzellen für die anschließende Objektträger-basierte zytometrische Analyse detektiert. Dazu wurde das Kultivierungsmedium abgesaugt. Die Deckgläschen wurden 15 min in PBS gewaschen und anschließend in einem 1:1 Gemisch aus Methanol/Aceton (beides Sigma-Aldrich GmbH, München) bei -20 °C für 20 min fixiert. Nach drei Waschschritten in PBS erfolgte die Inkubation der NPCs mit Blockierungslösung, bestehend aus 5 % BSA (paesel+lorei, Duisburg) und 0,5 % Tween (AppliChem GmbH, Darmstadt) gelöst in PBS, für 90 min bei RT. Der primäre Antikörper (His36 14-0660-82 (eBioscience, Frankfurt)) wurde 1:300 in PBS mit 1 % BSA verdünnt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen. Nach dem Waschen der Deckgläschen in PBS mit 1 % BSA wurde der 1:400 in PBS mit 1 % BSA verdünnte sekundäre Antikörper (*Goat-Anti-Mouse* FITC 115-096-020 (Dianova GmbH, Hamburg)) für 60 min auf den Zellen belassen. Nach erneutem Waschen in PBS mit 1 % BSA wurden die Deckgläschen mit DAPI *Mounting ProLong® Gold* (Invitrogen™-Life Technologies GmbH, Darmstadt) auf Objektträger aufgebracht. Die anschließende Quantifizierung der Kupfferzellen durch Objektträger-basierte Zytometrie wurde von Frau Dr. Anja Mittag im Translationalen Zentrum für Regenerative Medizin (TRM) Leipzig durchgeführt.



#### 3.3.4.2 Nachweis von Endothelien mittels OX-43 Färbung an Kryoschnitten

Nach Fixierung der Leberschnitte (siehe 3.3.1) wurden die Objektträger 3-mal 5 min mit 50 mM Tris (Roth, Karlsruhe) gewaschen. Die Blockierungslösung bestehend aus 5 % BSA in 50 mM Tris wurde für 20 min bei RT auf den Schnitten belassen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (*Mouse-Anti-Rat Ox-43 MCA276GA* 1:100 (Serotec, Puchheim)) erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Nach erneutem Waschen mit 50 mM Tris wurden die Schnitte für 60 min mit dem sekundären Antikörper (*Goat-Anti-Mouse FITC 115-096-020* 1: 200 (Dianova GmbH, Hamburg)) inkubiert. Nach dem abschließenden Waschen in 50 mM Tris wurden die Präparate mit DAPI *Mounting ProLong® Gold* eingedeckt und mikroskopisch analysiert und dokumentiert.

#### 3.3.4.3 GS-Färbung an Paraffinschnitten

Die Glutaminsynthetase (GS) wird in der Leber in 2-3 Hepatozytenschichten um die Verzweigungen der *Vena centralis* herum (perivenös) exprimiert. Die Detektion der GS erlaubt also die eindeutige perivenöse Zuordnung von Hepatozyten im Leberparenchym. Nach der wie unter 3.3.2 beschriebenen Demaskierung wurden die Schnitte für 30 min in Eiswasser abgekühlt und im Anschluss für 30 min mit einer Mischung aus 20 ml 30 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Roth, Karlsruhe) und 180 ml Methanol bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte in PBS für 5 min wurden die Schnitte mit einer BSA-Blockierungslösung (5 % BSA + 0,5 % Tween (AppliChem GmbH, Darmstadt) in PBS) für 60 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper (GS 610518 (BD, Heidelberg)) wurde 1:1000 mit 1 % BSA in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer auf dem Schnitt inkubiert. Die Schnitte wurden 3-mal für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 1:200 in PBS verdünnten sekundären Antikörper (*Goat-Anti-Mouse HPR 554002* (BD, Heidelberg)) für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden erneut 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen und mit DAB-Lösung (Thermo Scientific GmbH, Niedderau) nach Herstellerangaben für 10-15 min inkubiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun für 30 s und anschließendem Bläuen in Leitungswasser. Die Präparate wurden wie unter 3.3.2. beschrieben eingedeckt und ausgewertet.

#### 3.3.4.4 GS-/AIF Doppelfärbung an Paraffinschnitten

In apoptotischen Zellen wird das Protein „Apoptose-induzierender Faktor“ (AIF) exprimiert, so dass die Detektion des AIF im Leberparenchym apoptotische Zellen anzeigt. Bei gleichzeitiger Anfärbung der GS kann die perivenöse oder periportale Zuordnung getroffen werden. Nach der Demaskierung wie unter 3.3.2 beschrieben wurden die Schnitte

für 30 min in Eiswasser abgekühlt und im Anschluss für 30 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen der Schnitte in PBS für 5 min wurden diese mit einer BSA-Blockierungslösung (5 % BSA + 0,5 % Tween in PBS) für 60 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Der primäre Antikörper (AIF 04-430 (Millipore GmbH, Schwalbach)) wurde 1:600 mit 1 % BSA in PBS verdünnt und die Schnitte damit über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden 3-mal für 5 min in PBS gewaschen und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem 1:200 in PBS verdünnten sekundären Antikörper (*Donkey Anti-Rabbit* HRP (Dianova, Hamburg)) für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden erneut 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen und mit DAB-Lösung nach Herstellerangaben für 10-15 min inkubiert. Nach dem Waschen der Objektträger mit ddH<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für 60 min bei Raumtemperatur mit M.O.M. Block (MKB-2213 (Biozol, Eching)) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper (GS 610518 (BD, Heidelberg)) in einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Die Schnitte wurden 3-mal für 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem 1:200 in PBS verdünnten zweiten sekundären Antikörper (*Goat-Anti-Mouse* HPR 554002 (BD, Heidelberg)) für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert und danach erneut 3-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde für 2 min Histogreen Detektionslösung (Kit E-109 (Linaris, Dossenheim)) auf die Schnitte gegeben. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun. Vor dem Eindecken mit Entellan wurden die Objektträger 3-mal mit PBS gewaschen, in ddH<sub>2</sub>O gespült und kurz in Ethanol, anschließend in Xylol geschwenkt.

#### **3.3.4.5 Nachweis apoptotischer Zellen mit der TUNEL-Methode auf Paraffinschnitten**

Der Nachweis apoptotischer Hepatozyten im Leberparenchym erfolgte auf Paraffinschnitten mit dem TUNEL (*terminal transferase dUTP nick end labeling*) -Assay, der nach Herstellerangaben mit dem ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Kit (Merck Millipore GmbH, Schwalbach) durchgeführt wurde. Das Prinzip beruht auf der Markierung von DNA-Bruchstücken apoptotischer Zellkerne mit dUTP-Nukleotiden durch die Terminale Transferase. Mit Hilfe von ImageJ wurde der prozentuale Anteil der TUNEL-positiven, apoptotischen Zellen an der Gesamtzahl der Hepatozyten auf dem Paraffinschnitt quantitativ erfasst.

#### **3.3.4.6 Nachweis proliferierender Hepatozyten mittels Ki67-Färbung auf Paraffinschnitten**

Das Protein Ki67 ist während aller Phasen der Mitose im Zellkern detektierbar, so dass sein Nachweis die quantitative Erfassung proliferierender Zellen im Leberparenchym

erlaubt. Nach der Demaskierung wie unter 3.3.2 beschrieben wurden die Schnitte für 30 min in Eiswasser abgekühlt und danach für 30 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen der Schnitte in PBS für 5 min wurden die Schnitte mit einer BSA-Blockierungslösung (5 % BSA + 0,5 % Tween) in PBS) für 90 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert, worauf erneut mit einer Avidin- und Biotin-Blockierungslösung (Vector-Kit SP-2001 (Linaris, Dossenheim)) für je 20 min inkubiert wurde. Der 1:200 mit 1 % BSA in PBS verdünnte primäre Antikörper (Ki-67 ab66155 (abcam, Cambridge UK)) wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer auf die Schnitte gegeben und anschließend 3-mal für 5 min in PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem 1:200 verdünnten sekundären Antikörper (*Biotin-SP-conjugated affiniPure Goat Anti-Rabbit IgG* 111-065-003 (Dianova, Hamburg)) wurde für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer durchgeführt. Danach wurde erneut 3-mal für 5 Min mit PBS gewaschen und mit ABC-Reagenz (Vector-Kit PK-6100 (Linaris, Dossenheim)) für 30 min inkubiert. Nach 2-minütiger Inkubation mit Histogreen Detektionslösung (Kit E-109 von Linaris, Dossenheim) wurden die Objektträger 3-mal mit PBS gewaschen, in ddH<sub>2</sub>O gespült, kurz in Ethanol, dann in Xylol geschwenkt und anschließend mit Entellan (von Merck Millipore GmbH, Schwalbach) eingedeckt.

#### **3.3.4.7 Nachweis proliferierender Hepatozyten mittels PCNA-Färbung auf Paraffinschnitten**

Das Protein *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen* (PCNA) ist während der DNA-Replikation (S-Phase des Zellzyklus) im Zellkern nachweisbar, so dass seine Quantifizierung eine Aussage über den Anteil proliferierender Hepatozyten im Leberparenchym erlaubt. Nach der Demaskierung wie unter 3.3.2 beschrieben wurden die Schnitte für 30 min in Eiswasser abgekühlt und danach für 30 min mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 4 °C inkubiert. Nach Waschen der Schnitte in PBS für 5 min wurden diese mit einer BSA-Blockierungslösung (5 % BSA + 0,5 % Tween in PBS) für 60 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Blockierung mit einer Avidin- und Biotin-Blockierungslösung (Vector-Kit SP-2001 Linaris, Dossenheim) für je 30 min. Der 1:250 mit 1 % BSA in PBS verdünnte primäre Antikörper (PCNA GTX20029 (Gene Tex Inc. Irvine, USA)) wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer auf die Schnitte gegeben, dann 3 Mal für 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit dem 1:200 in PBS mit 1 % *Horse Serum* verdünnten sekundären Antikörper (*Horse-Anti-Mouse Biotin* (Vector, Linaris, Dossenheim)) für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 3 Mal für 5 min mit PBS gewaschen und mit ABC-Reagenz für 30 min inkubiert.

Nach der anschließenden 10-15-minütigen Inkubation in DAB-Lösung wurden alle Zellkerne durch die Inkubation der Schnitte für 30 s in Hämalaun und anschließendem Bläuen in Leitungswasser gefärbt und wie unter 3.3.2 beschrieben, entwässert und eingedeckt.

#### **3.3.4.8 Nachweis humaner Zellen mittels HepPar1-Färbung auf Paraffinschnitten**

Unter Verwendung des für das humane Antigen HepPar1 spezifischen Antikörpers lassen sich selektiv humane Zelltransplantate in dem für das Antigen negativen Mausleberparenchym nachweisen. Nach der Demaskierung wie unter 3.3.2 beschrieben wurden die Schnitte für 30 min in Eiswasser abgekühlt und dann für 30 min mit einer Mischung aus 20 ml 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 180 ml Methanol bei 4 °C fixiert. Nach dem Waschen der Schnitte in PBS für 5 min wurden diese mit einer BSA-Blockierungslösung für 60 min in einer feuchten Kammer bei RT inkubiert. Der 1:50 mit 1 % BSA in PBS verdünnte primäre Antikörper (HepPar1 M7158 (Dako Deutschland GmbH, Hamburg)) wurde über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer auf die Schnitte gegeben, anschließend 3 Mal für 5 min in PBS gewaschen und danach mit dem 1:200 in PBS verdünnten sekundären Antikörper (*Goat-Anti-Mouse* HPR 554002 (BD, Heidelberg)) für 60 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 3 Mal für 5 min mit PBS gewaschen und mit DAB-Lösung nach Herstellerangaben für 10-15 min behandelt. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun für 30 s und anschließendem Bläuen in Leitungswasser. Die Präparate wurden wie unter 3.3.2. beschrieben eingedeckt und ausgewertet.

### **3.4 Tierexperimentelle Arbeiten**

Alle tierexperimentellen Arbeiten wurden unter strenger Einhaltung der im Tierschutzgesetz verankerten Richtlinien durchgeführt und durch die zuständige Landesbehörde genehmigt (TV Nummern: 203.6.1-42205-2-673 MLU, 203.6.1-42205-2-905 MLU, 203.6.1-42205-2-981 MLU, 203.6.1-42205-2-732 MLU, 203.6.1-42205-2-1032 MLU). Die Versuchstierhaltung erfolgte unter 12 h Tag-Nacht- Rhythmus bei konstanter Temperatur von 25 °C und Fütterung einer Standarddiät für Nager.

### 3.4.1 Zelltransplantation

#### 3.4.1.1 Hepatozytentransplantation in der Ratte

Nach Einleitung der Narkose mit 2 Vol.-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und einer Sauerstoffflussrate von 2 l/min, erfolgte die Rasur und Desinfektion (Betaisodona<sup>®</sup> Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg)) des Abdomens. Nach der Präparation der abdominalen Muskulatur wurde die Abdominalhöhle mit einer Schere und einer chirurgischen Pinzette zirka 5 cm eröffnet. Nach Fixierung des Retraktors (Abb. 2 ① I) wurde der linke laterale Leberlappen proximal ligiert (3-0, PET Faden, geflochten, beschichtet (Catgut GmbH, Markneukirchen)) und resiziert (1/3 partielle Hepatektomie) (Abb. 2 ① II+III.). Die Darmschlingen wurden aus der Bauchhöhle gezogen, um so die *Vena portae* zugänglich zu machen. Nun erfolgte die Transplantation der Hepatozyten ( $7,5 \times 10^6$ ) mit einer 1 ml Spritze und einer 25G Kanüle (beides BD, Heidelberg). Die Zellen wurden langsam und gleichmäßig über einen Zeitraum von 2 min über die *Vena portae* (Abb. 2 ② IV) infundiert. Nach der Infusion erfolgte die Blutstillung an der *Vena portae* mit oxidiert regenerierter Zellulose (TABOTAMP<sup>®</sup> (Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt)). Nach Zurückverlagerung der Darmschlingen in die Bauchhöhle wurde diese mit einer Naht (3-0 USP PGA-Faden geflochten und resorbierbar, DS 19 (Catgut GmbH, Markneukirchen)) verschlossen und die Narkose ausgeleitet.

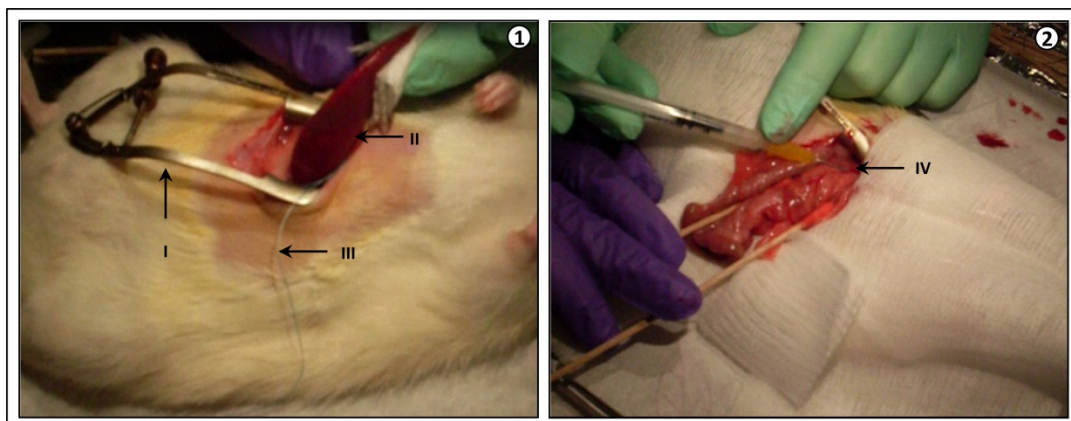


Abb.2 Transplantation von Hepatozyten in die Rattenleber

① zeigt die 1/3 Hepatektomie und ② zeigt die Injektion der Hepatozyten in die Portalvene. I Retraktor; II linker lateraler Leberlappen; III 3-0 Ligatur; IV *Vena portae*

#### 3.4.1.2 Stammzelltransplantation in der Maus

Die Vorbereitung des Tieres erfolgte wie unter 3.4.1.1 beschrieben. Die Abdominalhöhle wurde entlang der *Linea alba* mit einem 1 cm langen Schnitt eröffnet und der linke laterale Leberlappen wurde ligiert und resiziert. Nach Verschluss der Abdominalhöhle mit einer 3-

0 Naht (PGA-Faden geflochten und resorbierbar, DS 16 (Catgut GmbH, Markneukirchen)) erfolgte erneut die Eröffnung der Abdominalhöhle mit einem 0,5 cm langen Schnitt unterhalb des linken Rippenbogens. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Milz am Fettgewebe aus der Abdominalhöhle gezogen und median mit einer Ligatur (3-0, PET Faden, geflochten, beschichtet (Catgut GmbH, Markneukirchen)) ligiert (Abb. 3 ① II.) Zur Injektion der Zellen wurde mit einer 1 ml Spritze und einer 29G Kanüle der apikale Pol der Milz (Abb. 3 ① I) punktiert und mit der Ligatur so fixiert, dass ein Verrutschen der Kanüle verhindert wurde. Die Zellen ( $1 \times 10^6$ , 14 Tage hepatogen differenzierte hMSC) wurden nun langsam und gleichmäßig über einen Zeitraum von zirka 2 min injiziert. Nach der Injektion wurde die Kanüle langsam aus der Milz entfernt und dabei die Ligatur fest zugezogen, um eine Blutung aus dem Milzpol zu vermeiden (Abb. 3 ②). Die Zellen konnten nun aus der *Vena lienalis* über die *Vena portae* in die Leber abfließen. Die Milz wurde anschließend mit Hilfe eines Wattestäbchens wieder zurück in die Abdominalhöhle verlagert. Mit einer Naht (3-0 USP PGA-Faden geflochten und resorbierbar, DS 16 (Catgut GmbH, Markneukirchen)) wurde diese dann wieder verschlossen und die Narkose langsam ausgeleitet.

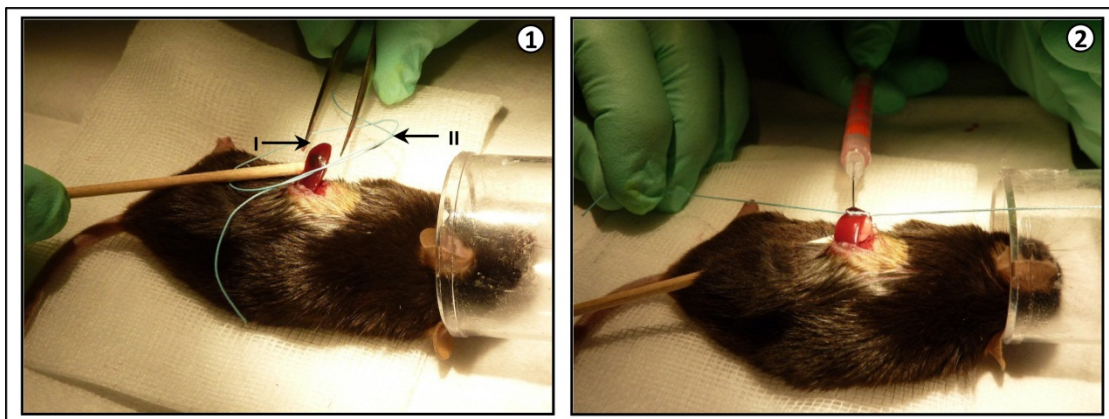


Abb.3 Transplantation von hMSCs in die Milz der Maus

① zeigt die Ligation der Milz und ② zeigt die Injektion der hMSCs in den apikalen Pol der Milz. I Apikaler Milzpol; II 3-0 Ligatur

### 3.4.1.3 Systemische Stammzelltransplantation in der Ratte

Nach Einleitung der Narkose mit 2 Vol.-% Isofluran (Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim) und einer Sauerstoffflussrate von 2 l/min erfolgte zur systemischen Applikation der Stammzellen über die Schwanzvene die Desinfektion der Schwanzwurzel der Ratte mit 70 %-igem Ethanol. Nach Punktion der Schwanzvene mit einer 26G Kanüle (BD, Heidelberg) wurden die Zellen ( $1,5 \times 10^6$ , 14 Tage hepatogen differenzierte rMSC) langsam über die Kanüle infundiert.

### 3.4.2 Vorbehandlung der Empfängertiere

#### 3.4.2.1 Retrorsin

Retrorsin hemmt die Proliferation der Hepatozyten im Wirtsparenchym nachhaltig und verschafft so transplantierten Zellen einen Proliferationsvorteil [30]. Vier und sechs Wochen vor der Hepatozytentransplantation erhielten die CD26-negativen *F344-Fischer* Empfänger-Ratten jeweils eine Retrorsininjektion (Sigma-Aldrich GmbH, München) von 30 mg/kg i.p.

#### 3.4.2.2 Propranolol

Der  $\beta$ -Rezeptorantagonist Propranolol hemmt transient die Proliferation der Hepatozyten im Wirtsleberparenchym, so dass für transplantierte Zellen ein initialer Wachstumsvorteil geschaffen wird [73]. Dieses Verfahren wurde bei den Versuchen zur akuten Leberschädigung der Mausleber durch Paracetamol angewendet. Drei Tage vor der Paracetamolintoxikation erhielten die *Pfp/Rag2<sup>-/-</sup>* Mäuse 60 mg/ kg Körpergewicht Propranololhydrochlorid (Merck Millipore GmbH, Schwalbach), welches über das Trinkwasser verabreicht wurde.

### 3.4.3 Immunsuppression

#### 3.4.3.1 Behandlung mit Cyclosporin A

Die Immunsuppression mit Cyclosporin A (Sandimmun<sup>®</sup> (Novartis Pharma GmbH, Nürnberg)) wurde direkt nach der allogenen Hepatozytentransplantation begonnen und dann täglich bis zum Tag der Leberentnahme mit einer i.p. Injektion von 7,5 mg/ kg Körpergewicht fortgesetzt. Der Blutspiegel an Cyclosporin A in den immunsupprimierten Tieren betrug zwischen 1500-2000 ng/ml.

#### 3.4.3.2 Behandlung mit Mycophenolat

Die Immunsuppression mit Mycophenolat (CellCept<sup>®</sup> (Roche, Grenzach-Wyhlen)) wurde direkt nach der allogenen Hepatozytentransplantation begonnen und dann bis zum Tag der Leberentnahme mit einer täglichen i.p. Injektion von 7,5 mg/ kg Körpergewicht fortgesetzt.

#### 3.4.3.3 Behandlung mit Gadoliniumchlorid

Zur Depletion der leberresidenten Makrophagen (Kupfferzellen) wurde 24 Stunden vor der allogenen Hepatozytentransplantation den Empfängertieren 12 mg/kg Körpergewicht Gadoliniumchlorid-Lösung (Sigma-Aldrich GmbH, München) über die Schwanzvene appliziert.

#### **3.4.4 Akute Leberschädigung durch Paracetamolintoxikation**

Bei den *Pfp/Rag2<sup>-/-</sup>* Mäusen wurde der akute Leberschaden 24 h vor der Transplantation der hMSC durch eine einmalige Injektion von 735 mg Paracetamol (Sigma-Aldrich GmbH, München) je kg Körpergewicht i.p. erzeugt.

Die CD26-negativen *F344-Fischer*-Ratten bekamen 3-mal je 4 g Paracetamol (Sigma-Aldrich GmbH, München) je kg Körpergewicht oral verabreicht. 6 h nach der letzten Paracetamolgabe erfolgte die Transplantation von  $1,5 \times 10^6$  rMSC (14 Tage hepatogen differenziert) systemisch über die Schwanzvene.

#### **3.4.5 Chronischen Leberschädigung durch CCl<sub>4</sub>-Inhalation**

Über 12 Wochen erfolgte 3 Mal wöchentlich die Applikation von Tetrachlorkohlenwasserstoff (CCl<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich GmbH, München)) für 2 min durch Inhalation. Zusätzlich erhielten die Tiere 0,35 mg/l Phenobarbital (Sigma-Aldrich GmbH, München) über das Trinkwasser. Die Gabe von CCl<sub>4</sub> und Phenobarbital führte bereits nach 12 Wochen zu einer histologisch nachweisbaren, fibrotischen Veränderung der Leberarchitektur.

#### **3.4.6 Blutentnahme und Aufarbeitung der Proben zur Bestimmung der Laborparameter**

Die Bestimmung von AST, ALT, Albumin und Bilirubin erfolgte im Blutserum durch das Zentrallaboratorium des Universitätsklinikums Halle (UKH). Zur Blutentnahme wurde die *Vena cava inferior* oder die *Vena jugularis* punktiert und das Blut in eine Serum-Monovette<sup>®</sup> (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gezogen. Die so gewonnenen Blutproben konnten bis zu 24 h bei 4 °C gelagert werden. Zur Abtrennung der zellulären Blutbestandteile erfolgte eine Zentrifugation der Proben bei 3000 x g für 5 min.

Die Bestimmung des INR im Citratblut und die Bestimmung des Cyclosporin A-Spiegels im EGTA-Vollblut erfolgten ebenfalls durch das Zentrallaboratorium des UKH. Dazu wurde das Blut in die entsprechenden Monovetten<sup>®</sup> aufgenommen.



## 4 Ergebnisse

Der klinische Erfolg der Hepatozytentransplantation scheitert unter anderem an der schlechten Repopularisierung der Empfängerleber durch die Spenderhepatozyten. Daher wurden zunächst im Rattenmodell Möglichkeiten zur Verbesserung der Effizienz der Hepatozytentransplantation getestet. Eine Möglichkeit besteht in der Verbesserung der immunsuppressiven Strategie zur Verringerung eventueller Abstoßungsreaktionen. Im 2. Abschnitt wurden dann alternative Zellressourcen untersucht, um den Mangel an Spenderlebern zur Isolierung von Hepatozyten abzumildern. Dazu wurde die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Hepatozyten-ähnliche Zellen untersucht. Zur Übertragbarkeit auf ein der menschlichen Situation näheren Großtiermodell wurden auch Stammzellen aus dem Schwein getestet.

### 4.1 Vergleich der zeitabhängigen Integration syngener und allogener Hepatozyten nach Transplantation im Rattenmodell

Zunächst wurde die zeitabhängige Integration von portalvenös applizierten syngenem (von genetisch identischen Individuen stammend) und allogenen Hepatozyten (von genetisch verschiedenen Individuen stammend) verglichen. Dabei stand im Fokus unserer Betrachtung, ob allogene Hepatozyten trotz Applikation über die Portalvene abgestoßen werden und wenn ja, wann diese Abstoßung erfolgt. Zum Überblick ist der Versuchsablauf in Abb. 4 schematisch dargestellt. 6 Wochen und 4 Wochen vor allogener bzw. syngener Hepatozytentransplantation erfolgte die Vorbehandlung der Empfängertiere mit Retrorsin. Zum Transplantationszeitpunkt (0 h) erfolgte zusätzlich eine 1/3 Hepatektomie. Die Lebern der Empfängertiere wurden 4 h, 16 h, 24 h, 5 Tage und 3 Wochen nach der Transplantation histologisch ausgewertet.

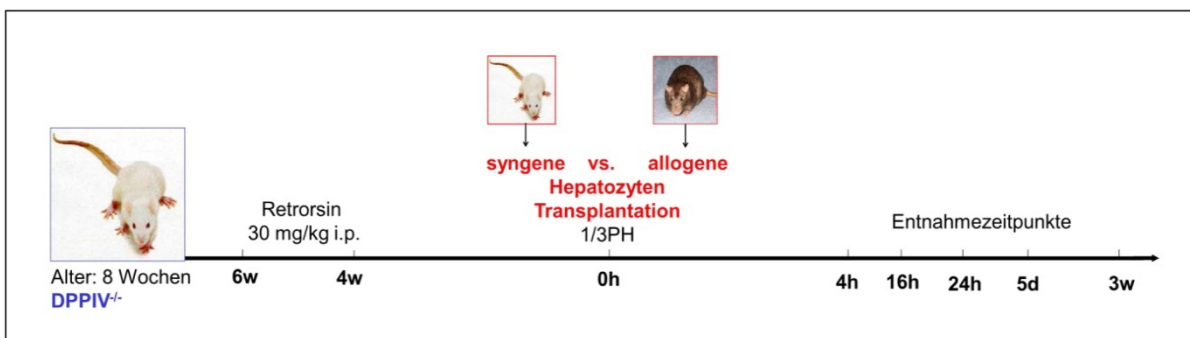
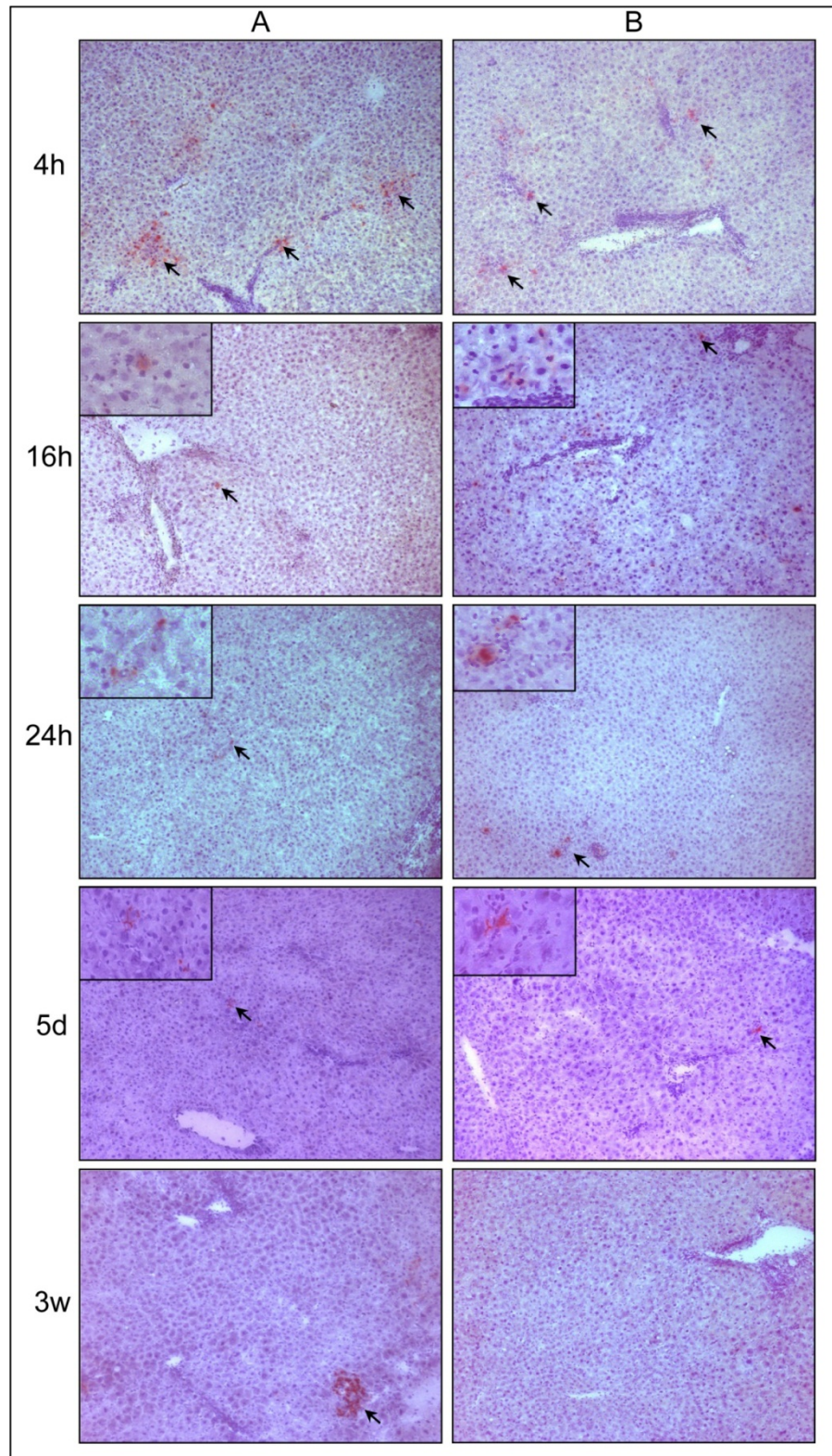


Abb.4 Übersicht zum Versuchsverlauf der allogenen/syngenen Hepatozytentransplantation

8 Wochen alte Empfängertiere (DPPIV<sup>-/-</sup>) wurden 6 und 4 Wochen vor der Transplantation mit Retrorsin (30 mg/kg i.p.) vorbehandelt. Nach einer 1/3 Hepatektomie (PH) erfolgte die portalvenöse Applikation von  $7,5 \times 10^6$  allogenen bzw. syngenen Hepatozyten. Nach 4 h, 16 h, 24 h, 5 d und 3 w erfolgte die Leberentnahme und die histologische Auswertung.

Bereits vier Stunden nach der portalvenösen Injektion der syngen, primären Wildtyp-Spenderhepatozyten (CD26-positiv) konnten diese erstmals im Leberparenchym des Empfängertieres nachgewiesen werden (Abb. 5 A). Zunächst befanden sich die Spenderzellen in den Portalgefäßen oder in deren unmittelbarer Nähe. 16 h und 24 h nach der Zellinjektion waren einzelne Spenderzellen im Empfängerparenchym detektierbar. Zu diesen Zeitpunkten scheinen die Spenderhepatozyten noch nicht vollständig im Empfängerparenchym integriert zu sein, da die diffuse CD26-Färbung auf eine Verteilung auf der gesamten Zelloberfläche hinweist. 5 Tage nach der Transplantation waren bereits kleine (1-3 Zellen), im Parenchym integrierte Cluster von Spenderhepatozyten zu sehen. Die Expression von CD26 war nun membranständig auf der apikalen Seite der Spenderhepatozyten lokalisiert. Das deutet darauf hin, dass die Spenderzellen funktionelle Kontakte mit den benachbarten Hepatozyten des Wirtsparenchyms ausbilden. 3 Wochen nach der Hepatozyteninjektion waren die Cluster auf eine Größe von 5-8 Spenderzellen angewachsen (Abb. 5 A).

Nach der Transplantation von allogenen Spenderhepatozyten (Abb. 5 B) unterscheidet sich die Verteilung und Integration der Zellen bis zum Tag 5 nach Spenderzellinjektion nicht von dem syngen Transplantationsmodell. Auch hier persistierten bis zum Tag 5 nach Transplantation deutlich parenchymal integrierte Cluster allogener Zellen. Hingegen 3 Wochen nach der Zelltransplantation konnten keine allogenen Spenderzellen mehr im Leberparenchym der Empfängertiere nachgewiesen werden. Die allogenen Spenderhepatozyten wurden also im Zeitraum von 5 Tagen bis 3 Wochen nach der Transplantation aus dem Empfängerparenchym eliminiert, so dass eine immunsuppressive Therapie zur langfristigen Persistenz allogener Hepatozyten erfolgen muss.



**Abb.5 Vergleich der Transplantation syngener (A) und allogener (B) Hepatozyten**  
 Gezeigt ist der enzymatische CD26-Nachweis der transplantierten Spenderhepatozyten (rot) im CD26-negativen Empfängerparenchym 4 h, 16 h, 24 h, 5 d und 3 Wochen (w) nach der Transplantation. Die Applikation der syngenen (A) sowie allogenen (B) Hepatozyten ( $7,5 \times 10^6$ ) erfolgte über die Portalvene. Zellkerne des Empfängerparenchyms sind mit Hämalaun (blau) angefärbt. Die Pfeile weisen auf die Spenderhepatozyten. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren. (Vergrößerung: 100x)

## 4.2 Immunsuppression nach allogener Hepatozytentransplantation

### 4.2.1 Lebermakrophagen sind notwendig aber nicht ausschließlich an der Abstoßung beteiligt

Dass die leberresidenten Makrophagen (Kupfferzellen) an der Eliminierung syngener transplantierte Hepatozyten aus den Sinusoiden beteiligt sind, wurde von Joseph *et. al* gezeigt [74]. Um eine bessere Akzeptanz der allogenen Spenderzellen im Empfängerparenchym zu erzielen, wurde deshalb zunächst untersucht, inwieweit die Kupfferzellen an der Abstoßung beteiligt sind. Experimentell können Kupfferzellen durch Gadoliniumchlorid eliminiert werden [75]. Daher wurden die Empfängertiere 24 h vor der Transplantation mit einer einmaligen intravenösen Injektion von Gadoliniumchlorid ( $\text{GdCl}_3$ ) vorbehandelt und die Integration allogener Hepatozyten 3 Wochen nach Transplantation untersucht (Abb. 6).

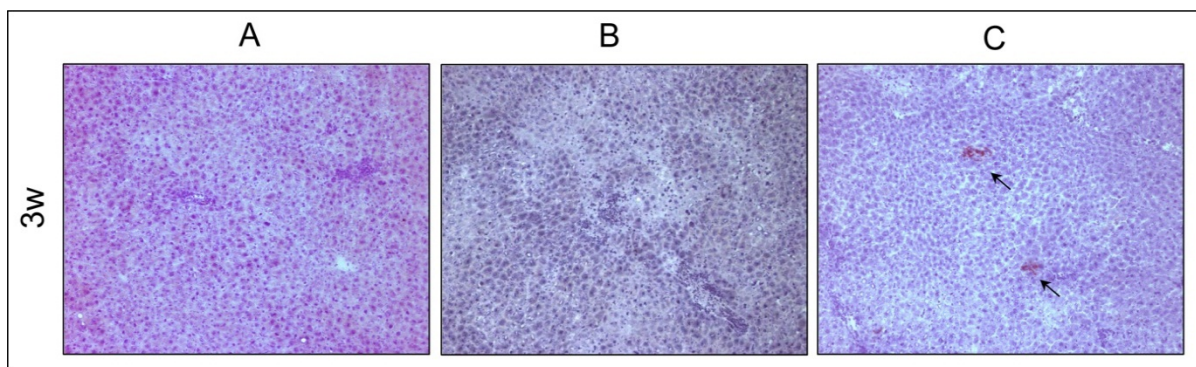


Abb.6 **Abstoßung allogener Hepatozyten nach Kupferzelledepletion**

Transplantierte Spenderhepatozyten (rot) wurden durch den enzymatischen Nachweis des CD26 im ansonsten negativen Empfängerparenchym 3 Wochen nach allogener Hepatozytentransplantation in Kryoschnitten detektiert. (A) zeigt einen Leberschnitt aus einer unbehandelten Leber und (B) einen Schnitt aus der Leber eines Tieres, das einmalig mit  $\text{GdCl}_3$  (12mg/kg) über die Schwanzvene zur Depletion der Kupfferzellen behandelt wurde. In (C) ist eine syngene Kontrolle gezeigt. Die Applikation der allogenen Hepatozyten ( $7,5 \times 10^6$ ) erfolgte über die Portalvene. Zellkerne des Empfängerparenchyms sind mit Hämalaun (blau) angefärbt. Die Pfeile weisen auf die Spenderhepatozyten. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren. (Vergrößerung: 100x)

Die Behandlung mit  $\text{GdCl}_3$  führte nicht zu einer verbesserten Transplantatakzeptanz. 3 Wochen nach der Transplantation waren keine allogenen Spenderhepatozyten im Empfängerleberparenchym nachweisbar (Abb. 6 B). Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass die Gadoliniumchlorid-Behandlung nicht zur Depletion der Kupfferzellen führte. Um dies auszuschließen, wurde 3 Wochen nach Transplantation die Nichtparenchymzellfraktion der Leber isoliert und die Kupfferzellen mittels Objektträger-basierter zytometrischer Analyse nachgewiesen (Abb.7). In Empfängern ohne Gadoliniumchlorid-

Behandlung konnten zirka 20 % Kupfferzellen innerhalb der Nichtparenchymzellfraktion detektiert werden (Abb. 7 A, B).

Im Gegensatz dazu wurden in Empfängern nach Gadoliniumchlorid-Behandlung nur noch zirka 1 % Kupfferzellen in der Nicht-Parenchymzellfraktion detektiert (Abb. 7 C). Die Depletion der Kupfferzellen durch Gadoliniumchlorid war somit weitgehend erfolgreich, so dass davon ausgegangen werden kann, dass noch andere Immunzellen an der Abstoßung der allogenen Hepatozyten beteiligt sind.

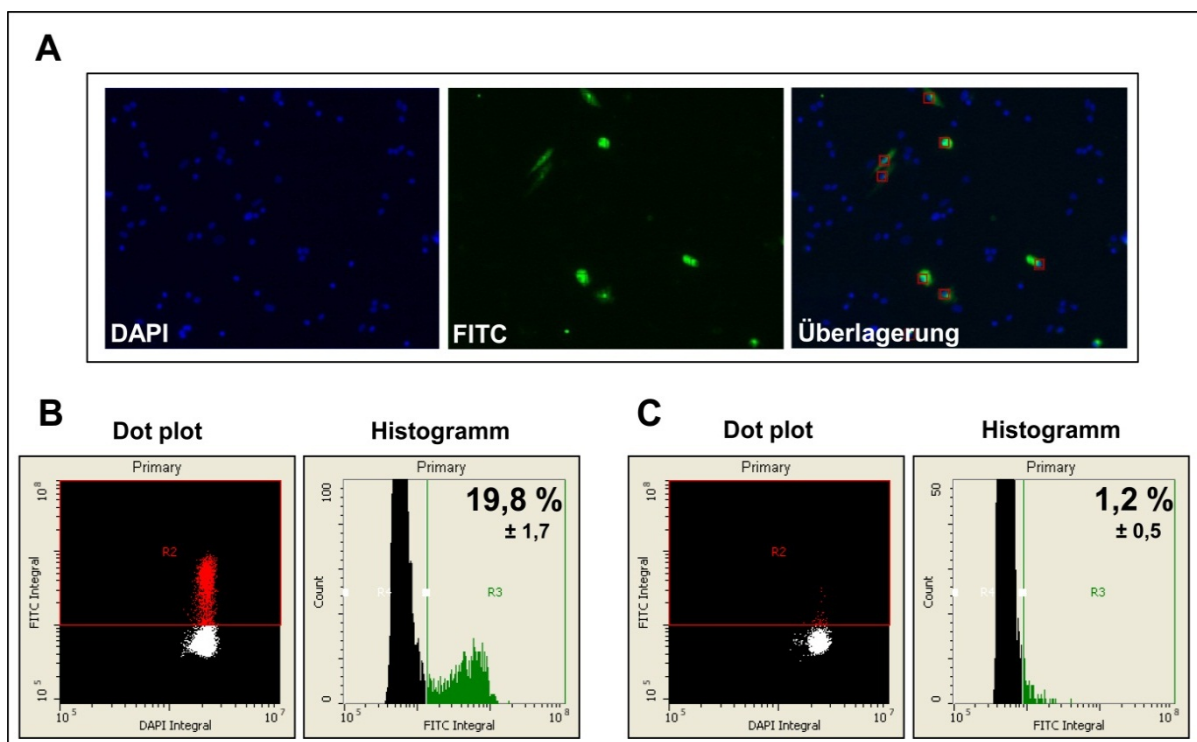


Abb.7 Objektträger-basierte zytometrische Analyse von Kupfferzellen in Lebern aus Tieren ohne (A, B) und mit  $GdCl_3$ -Behandlung (C)

In (A) wurden Kupfferzellen der nichtparenchymalen Leberzellfraktion immunocytochemisch detektiert (primärer Antikörper: His36 *mouse anti rat* 1:300; sekundärer Antikörper: FITC *goat anti mouse* 1:400). Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Die für die quantitative Analyse durch das Zytometer erfaßten FITC-positiven Zellen sind rot umrahmt. (B) und (C) zeigen die quantitative Objektträger-basierte Analyse (Histogramm und Dot plot) der Nicht-Parenchymzellfraktion der Leber. (n=6)

#### 4.2.2 Beteiligung von T- und B-Zellen an der Abstoßung von Hepatozytentransplantaten

Um die Beteiligung von T-Zellen an der Abstoßung von Hepatozytentransplantaten zu untersuchen, wurden zwei in der klinischen Anwendung übliche Immunsuppressiva getestet: Cyclosporin A, welches als Calcineurininhibitor die Aktivierung von T-Zellen

unterdrückt und ein Inhibitor der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, das Mycophenolat. Mycophenolat inhibiert als Zytostatikum die Proliferation von T- und B- Zellen.

Der Versuchsablauf ist in Abb. 8 schematisch dargestellt. Zum Zeitpunkt 0 h wurden nach Retrorsinbehandlung und 1/3 Hepatektomie allogene Hepatozyten (DPPIV<sup>+/+</sup>) in 8 Wochen alte DPPIV<sup>-/-</sup> F344 Fischer-Ratten portalvenös transplantiert. Dabei wurden eine Versuchsgruppe bis zum Entnahmezeitpunkt mit Cyclosporin und eine weitere Versuchsgruppe mit Mycophenolat immunsupprimiert.

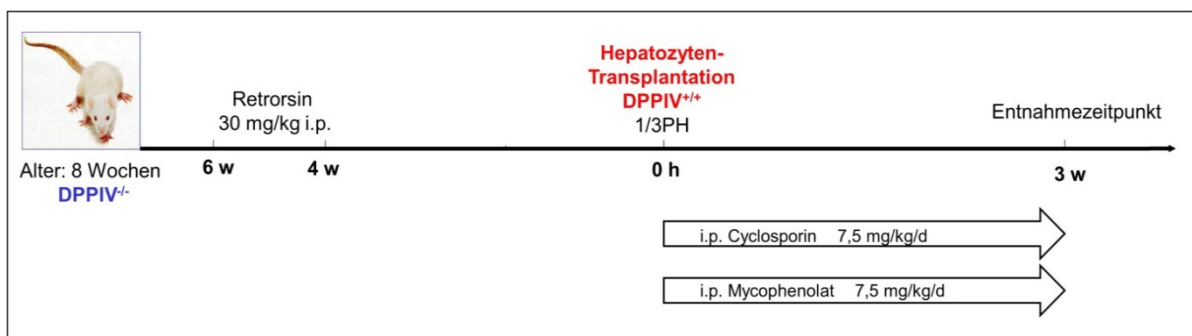


Abb.8 Übersicht zum Versuchsverlauf der allogenen Hepatozytentransplantation mit Immunsuppression

8 Wochen alte Empfängertiere (DPPIV<sup>-/-</sup>) wurden 6 und 4 Wochen vor der Transplantation mit Retrorsin (30 mg/kg i.p.) vorbehandelt. Nach einer 1/3 Hepatektomie (PH) erfolgte die portalvenöse Applikation von  $7,5 \times 10^6$  allogenen Hepatozyten. Nach 3 wöchiger, täglicher Immunsuppression mit Mycophenolat oder Cyclosporin erfolgte die Leberentnahme bzw. histologische Auswertung.

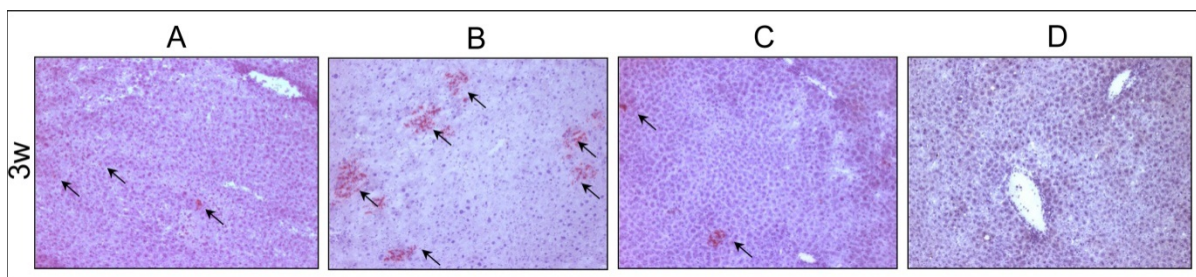


Abb.9 Transplantation allogener Hepatozyten mit Mycophenolat- oder Cyclosporin-Behandlung als Immunsuppression

Transplantierte Spenderhepatozyten (rot) wurden durch den enzymatischen Nachweis des CD26 im ansonsten negativen Empfängerparenchym 3 Wochen nach allogener Hepatozytentransplantation in Kryoschnitten detektiert. (A) zeigt einen Leberschnitt eines Tieres unter täglicher Immunsuppression mit Mycophenolat (7,5 mg/kg, i.p.) und (B) zeigt einen Leberschnitt eines Tieres unter täglicher Immunsuppression mit Cyclosporin (7,5 mg/kg, i.p.). In (C) ist eine syngene und in (D) ist eine allogene Kontrolle ohne Immunsuppression gezeigt. Die Applikation der allogenen bzw. syngenen Hepatozyten ( $7,5 \times 10^6$ ) erfolgte über die Portalvene. Zellkerne des Empfängerparenchyms sind mit Hämalaun (blau) angefärbt. Die Pfeile weisen auf die Spenderhepatozyten. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren. (Vergrößerung: 100x)

Die tägliche Behandlung der Empfängertiere mit Mycophenolat ergab, dass zwar allogene Spenderzellen 3 Wochen nach der Transplantation im Empfängerparenchym persistierten, die Clustergröße jedoch nicht wie im syngenem Transplantationsmodell auf 5-8 Spenderzellen angewachsen war (Vergleiche Abb. 9 A mit Abb. 9 C). Mycophenolat

verhindert somit zwar die Abstoßung der allogenen Spenderhepatozyten, beeinträchtigt aber aufgrund seiner zytostatischen Wirkung zugleich deren Ausbreitung im Empfängerparenchym.

3 Wochen nach allogener Hepatozytentransplantation bei täglicher Behandlung mit Cyclosporin A konnten Cluster von 5-8 Spenderzellen im Empfängerparenchym nachgewiesen werden (Abb. 9 B). Die Immunsuppression mit Cyclosporin verhinderte somit effektiv die Abstoßung der allogenen Hepatozyten. Daraus kann geschlossen werden, dass erwartungsgemäß T- und B-Zellen an der Abstoßungsreaktion beteiligt waren. Zusätzlich ist festzustellen, dass in Gegenwart von Cyclosporin A wesentlich mehr Cluster allogener Spenderzellen im Leberparenchym persistierten als nach syngener Hepatozytentransplantation ohne Immunsuppression (Vergleiche Abb. 9 B mit Abb. 9 C). Dies weist darauf hin, dass Cyclosporin A die Repopularisierung verbesserte. Sollte diese Hypothese richtig sein, dann müsste dies auch im syngenem Transplantationsmodell der Fall sein.

#### **4.3 Verbesserung der Repopularisierung des Empfängerparenchyms durch Cyclosporin A im syngenem Transplantationsmodell**

Um zu untersuchen, ob Cyclosporin A die Integrationsrate von transplantierten Hepatozyten generell erhöht, wurden *F344* CD26-negative Empfängerratten unmittelbar nach der Transplantation syngener Hepatozyten aus Wildtyp-Ratten mit Cyclosporin A behandelt und mit Empfängern ohne Cyclosporinbehandlung verglichen.

Auch im syngenem Transplantationsmodell konnten 5 Tage nach Transplantation wesentlich mehr Spenderzellcluster in Empfängern mit Cyclosporinbehandlung (Abb. 10 A) detektiert werden als in Empfängern ohne Cyclosporinbehandlung (Abb. 10 C). So betrug die mittels FACS quantifizierte Repopularisierungsrate mit syngenem Hepatozyten nach 5 Tagen mit Cyclosporin A 1 % (Abb. 10 B). Im Gegensatz dazu betrug die Repopularisierungsrate in Empfängern ohne Behandlung nur 0,5 % (Abb. 10 D).

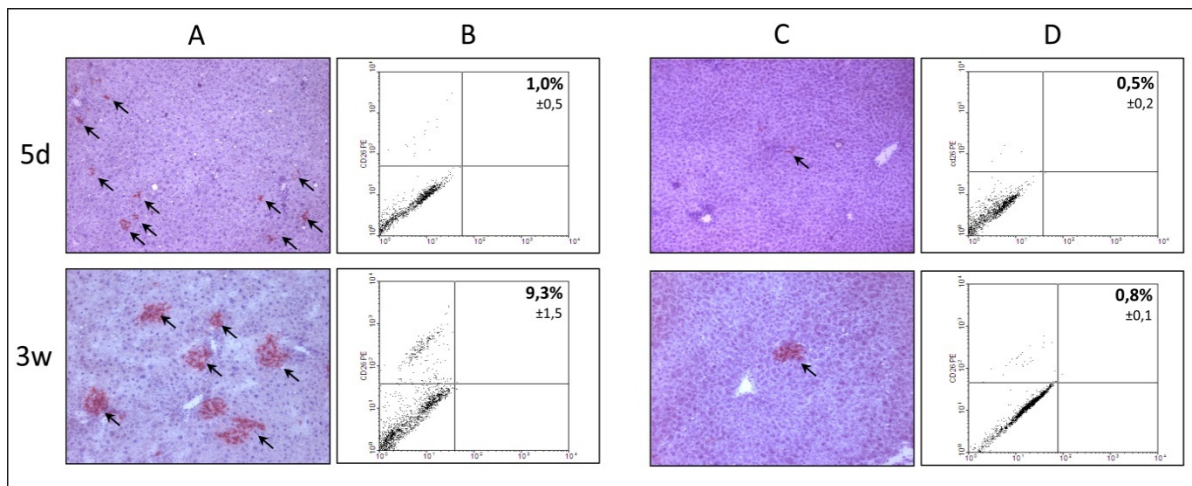


Abb.10 Quantifizierung der Repopularisierungsrate des Empfängerparenchyms durch syngene Spenderhepatozyten

In (A) sind Kryoschnitte aus Lebern von Empfängertieren, welche mit Cyclosporin A (7,5 mg/kg/d) behandelt wurden, und in (C) aus Lebern von unbehandelten Tieren 5 Tage und 3 Wochen nach Hepatozytentransplantation gezeigt. Spenderhepatozyten (rot) wurden enzymatisch durch die CD26-Aktivität nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hämalaun (blau) visualisiert. Die Pfeile weisen auf Cluster von Spenderhepatozyten. (Vergrößerung: 100x) (B) und (D) zeigen die mittels Durchflusszytometrie bestimmten Dot plots der quantitativen Analyse der Spenderhepatozyten im Empfängerparenchym (n=3) 5 Tage und 3 Wochen nach Zelltransplantation.

3 Wochen nach der Transplantation war die Repopularisierungsrate mit syngenen Spenderhepatozyten nach Cyclosporinbehandlung zehnfach höher als in Empfängertieren ohne Behandlung (Vergleiche Abb. 10 A und B mit Abb. 10 C und D). Um auszuschließen, dass diese Erhöhung der Repopularisierungsrate selbst im syngenen Transplantationsmodell auf durch Cyclosporin A unterdrückte immunologische Effekte zurückzuführen war, wurde die Cyclosporin Behandlung nach 5 Tagen abgebrochen und die Repopularisierung 3 Wochen nach der Transplantation im Vergleich zu bis dahin ununterbrochen behandelten Tieren bestimmt. Die Repopularisierungsrate war in Empfängerlebern mit durchgehender Cyclosporin Behandlung nicht unterschiedlich von Empfängerlebern aus Tieren nach Abbruch der Behandlung.

Die Verbesserung der Repopularisierungsrate durch Cyclosporin A könnte zwei Ursachen haben. (1) Cyclosporin A stimuliert die Proliferation der Spenderhepatozyten im Wirtsparenchym. Dagegen spricht die Tatsache, dass die Zellcluster in behandelten und unbehandelten Tieren gleich groß waren. (2) Cyclosporin A verbessert den Übertritt der Spenderzellen ins Wirtsparenchym, so dass mehr voneinander unabhängige Cluster entstehen können. Der Übertritt der Spenderzellen ins Parenchym wird im Wesentlichen durch die Endothelzellbarriere bestimmt. In früheren Versuchen anderer Gruppen wurde gezeigt, dass nach Zerstörung der Endothelien eine Verbesserung der Repopularisierung erreicht werden konnte [76]. Daher wurde die Hypothese, dass Cyclosporin unabhängig



von seiner immunsuppressiven Wirkung den Übertritt der Spenderzellen über die Endothelbarriere begünstigt, untersucht. Dazu wurden in Lebern aus behandelten und unbehandelten Empfängertieren die sinusoidalen Endothelien immunhistochemisch anhand der Expression des Oberflächenproteins Ox-43 angefärbt (Abb. 11).

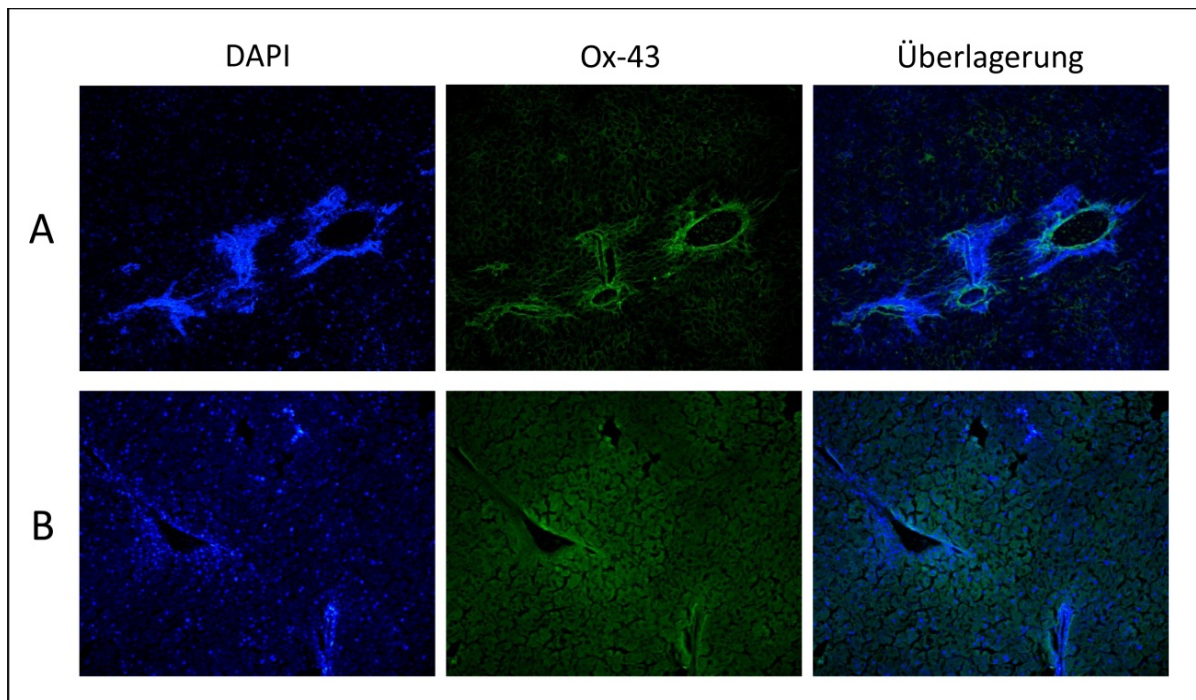


Abb.11 Visualisierung von Leberendothelien aus unbehandelten Tieren (A) und nach Behandlung mit Cyclosporin A (B) mittels immunhistochemischer Detektion des Markers Ox-43

Gezeigt ist die Endothelzellfärbung (primärer Antikörper: *mouse anti rat Ox-43* (1:100) und sekundärer Antikörper: FITC *anti mouse* (1:200)) in Lebern aus Empfängertieren 3 Wochen nach der Transplantation von Hepatozyten. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). (Vergrößerung 100 x) Cyclosporin A wurde täglich (7,5 mg/kg) verabreicht. In behandelten Tieren (B) ist eine deutlich verminderte Detektion von Ox-43 sichtbar. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren.

3 Wochen nach Hepatozytentransplantation waren in Lebern aus mit Cyclosporin A behandelten Tieren deutlich geringere Immunfluoreszenzsignale von Ox-43 (Abb. 11 B) zu erkennen als in Empfängern ohne Cyclosporinbehandlung (Abb. 11 A). Vorausgesetzt, dass die Expression von Ox-43 durch Cyclosporin A nicht vermindert wurde, könnte Cyclosporin A also zur Öffnung der Endothelien führen, so dass mehr Spenderhepatozyten ins Parenchym übertreten und somit die Repopularisierung verbessert werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Immunsuppression nach Hepatozytentransplantation durch nicht zytostatisch wirkende Immunsuppressiva erfolgen

sollte. Darüber hinaus könnten Verfahren, die den Übertritt der transplantierten Zellen über das Endothel erleichtern, die Effizienz der Hepatozytentransplantation verbessern. Cyclosporin A, das klinisch häufig zur Immunsuppression nach Organtransplantation angewendet wird, könnte hier Mittel der Wahl sein.

#### **4.4 Isolierung und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Fettgewebe der Ratte als Alternative zu Hepatozyten für die Transplantation**

Aufgrund des Mangels an Spenderorganen stehen primäre Hepatozyten als Zellquelle für die Hepatozytentransplantation nur unzureichend zur Verfügung. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Zellquellen erschlossen und hinsichtlich ihrer zellulären Eigenschaften und therapeutischen Anwendbarkeit im Tiermodell untersucht. Adulte, mesenchymale Stammzellen (MSC) scheinen besonders gut geeignet zu sein, da sie im Vergleich zu embryonalen Stammzellen weniger ethische Bedenken hervorrufen, im Vergleich zu induzierten pluripotenten Stammzellen geringere Sicherheitsrisiken bergen (Tumorbildung) und gut verfügbar sind [69]. In der vorliegenden Arbeit wurden die MSC der Ratte untersucht, da verschiedene Modelle für Lebererkrankungen zur Verfügung standen, in denen die therapeutische Wirksamkeit der Zellen untersucht werden konnte.

Die MSC wurden aus dem viszeralen Fettgewebe der Ratte (rMSC) isoliert und im undifferenzierten Zustand mittels FACS-Analyse auf das Vorhandensein von stammzellspezifischen Markern überprüft (Abb. 12).

Es musste sich auf eine Auswahl beschränkt werden, da für die Ratte nur wenige Antikörper für die Analyse kommerziell zur Verfügung standen. Es konnte gezeigt werden, dass die rMSC das für mesenchymale Stammzellen charakteristische Oberflächenmolekül CD44 zu zirka 40 % auf ihrer Oberfläche exprimierten (Abb. 12 CD44). Das ebenfalls für MSC charakteristische Oberflächenmolekül CD29 wurde nahezu zu 100 % auf der Oberfläche exprimiert (Abb. 12 CD29). Im Gegensatz dazu exprimierten nur zirka 2 % der isolierten rMSC das hämatopoetische Oberflächenmolekül CD45 (Abb. 12 CD45). Die hier isolierte Zellfraktion enthielt demnach überwiegend mesenchymale Stammzellen mit geringer Kontamination an hämatopoetischen Zellen.

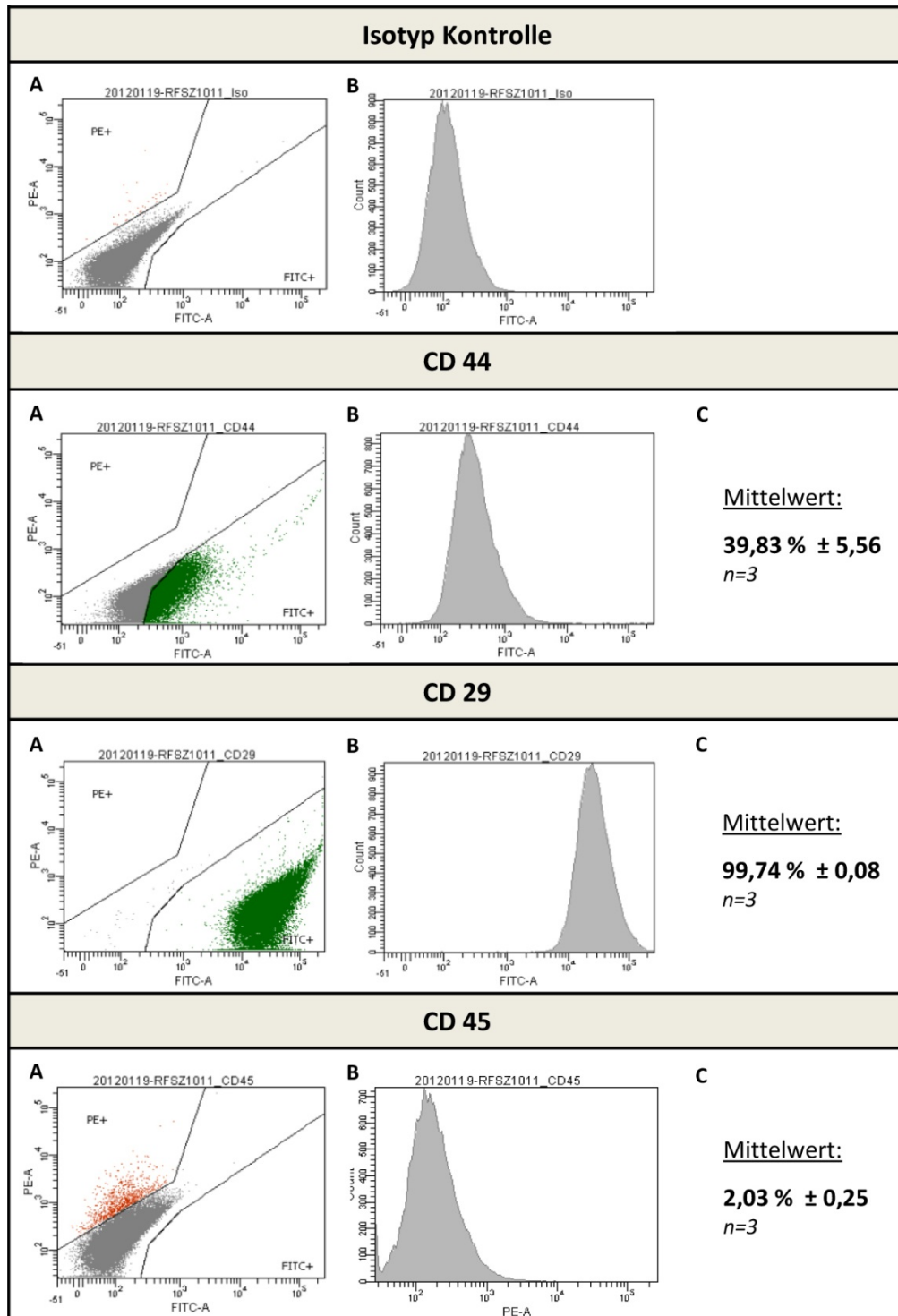


Abb.12 Durchflußzytometrische Analyse von rMSCs

Gezeigt ist jeweils in (A) der Dot plot, in (B) das Histogramm und in (C) die statistische Auswertung ( $n=3$ ) der durchflußzytometrischen Analyse für die Oberflächenmoleküle CD44, CD29, CD45 sowie die Isotypkontrolle in undifferenzierten, mesenchymalen Stammzellen (rMSCs) aus dem visceralen Fettgewebe der Ratte. Mit der Isotypkontrolle wurde die Eigenfluoreszenz der rMSC ausgeschlossen.

Ein weiteres charakteristisches Merkmal mesenchymaler Stammzellen ist ihre multiple Differenzierungsfähigkeit, die gemäß Definition mindestens drei verschiedene Entwicklungslinien aufweisen soll [77]. Hier wurden osteogene, adipogene und hepatogene Differenzierung untersucht.

Nach 8 Tagen Kultur der rMSC im adipogenen Differenzierungsmedium konnten in den rMSC mit Sudan III für Adipozyten typische Lipidansammlungen detektiert werden (Abb. 13 A). Des Weiteren konnte mittels semi-quantitativer RT-PCR die mRNA der in Adipozyten exprimierten Lipoproteinlipase (LPL) nachgewiesen werden (Abb. 13C, oben).

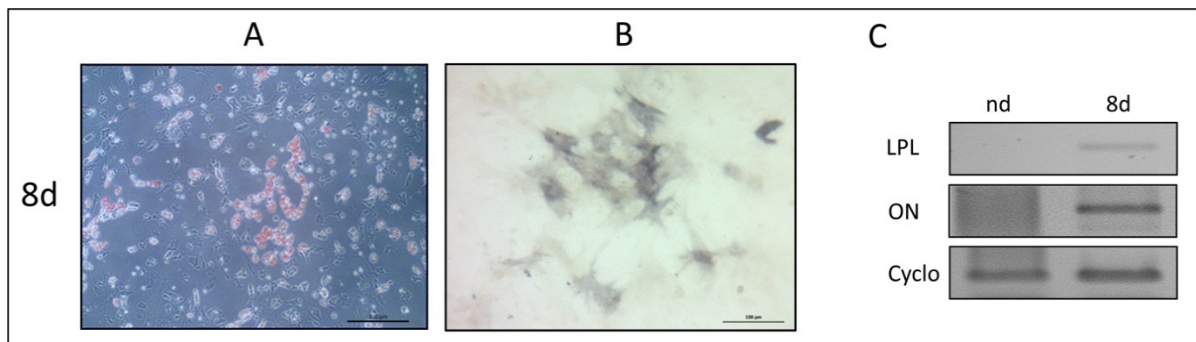


Abb. 13 Adipogene (A) und osteogene (B) Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem visceralen Fettgewebe der Ratte

In (A) sind nach 8 Tagen adipogener Differenzierung mittels Sudan III-Färbung typische Fettablagerung sichtbar gemacht worden (rot). In (B) ist nach 8 Tagen (8d) osteogener Differenzierung die alkalische Phosphatase cytochemisch mittels BCIP nachgewiesen. (C) zeigt das Vorhandensein der mRNA von in Adipozyten (LPL: Lipoproteinlipase) und Osteozyten (ON: Osteonectin) spezifisch exprimierten Genen. Cyclo: Cyclophilin (Ladungskontrolle), nd: undifferenziert. (Vergrößerung: 100x)

Nach 8 Tagen Kultur der rMSC im osteogenen Differenzierungsmedium konnte die für Osteozyten spezifische, alkalische Phosphatase zytochemisch in der Zellkultur nachgewiesen werden (Abb. 13B). Weiterhin exprimierten die 8 Tage osteogen differenzierten rMSC das in Osteozyten spezifisch exprimierte Osteonectin (ON) (Abb. 13C, Mitte).

21 Tage nach hepatogener Differenzierung der rMSC konnte die Einlagerung von Glykogen mittels der PAS-Reaktion nachgewiesen werden (Abb. 14 B). Auch konnte mittels semiquantitativer RT-PCR ein Anstieg der Expression hepatozytenspezifischer Gene wie Transferrin, CD26 und Albumin im Verlauf der Differenzierung belegt werden. Die Transkriptmenge der mRNA des Alphafetoproteins, welches nur in fötalen

Hepatozyten und Tumorzellen gebildet wird, nimmt im Verlauf der hepatogenen Differenzierung der rMSC ab und ist an Tag 21 der Differenzierung nicht mehr nachweisbar (Abb. 14 C). Die geringe Expression einiger der untersuchten hepatozytenspezifischen Gene in undifferenzierten rMSC könnte auf eine gewisse hepatozytäre Prägung der MSC aus dem Fettgewebe hinweisen.

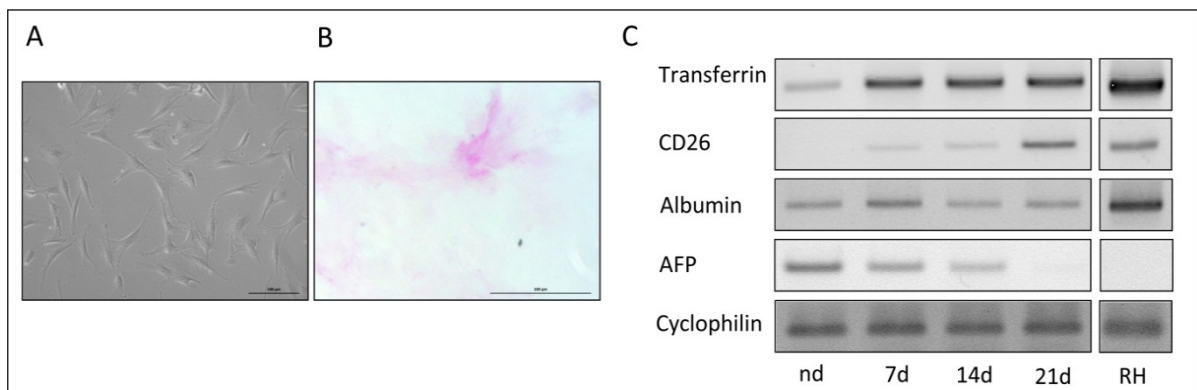


Abb.14 **Hepatogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem visceralen Fettgewebe der Ratte**

In (A) sind undifferenzierte rMSC im Phasenkontrastmikroskop dargestellt. Sie weisen die typische spindelförmige Gestalt mesenchymaler Stammzellen auf. In (B) wurden die Zellen nach 21 Tagen hepatogener Differenzierung mittels PAS-Färbung, die Polysaccharide wie z.B. das in Hepatozyten vorkommende Glykogen erfasst, sichtbar gemacht. (C) zeigt die Expression von für Hepatozyten typischen mRNA-Spezies in undifferenzierten (nd) und für 7, 14, und 21 Tage in hepatogenem Differenzierungsmedium kultivierten rMSC. AFP: Alphafetoprotein, RH: primäre Rattenhepatozyten (Vergleichskontrolle), Cyclophilin: Ladungskontrolle

Zusammenfassend lassen sich also mesenchymale Stammzellen aus dem visceralen Fettgewebe der Ratten isolieren. Diese erfüllen wesentliche mesenchymale Stammzellkriterien wie Plastikadhärenz, die Expression mesenchymaler Marker und multiples Differenzierungspotential. Die Zellen wurden anschließend hinsichtlich ihres therapeutischen Potentials bei Lebererkrankungen in Tiermodellen der akuten (Paracetamol-induziertes toxisches Leberversagen) und chronischen (CCl<sub>4</sub>-induzierte Zirrhose) Leberschädigung untersucht.

## 4.5 Applikation von mesenchymalen Stammzellen bei akuter Leberschädigung

### 4.5.1 Wirkung von rMSC auf die durch Paracetamol induzierte akute Leberschädigung in der Ratte

Die Metabolisierung von Paracetamol in perivenösen Hepatozyten führt zur Bildung toxischer Endprodukte, die schließlich zum Zelluntergang führen. In der vorliegenden Arbeit wurde CD26-negativen *F344 Fischer*-Ratten Paracetamol verabreicht. Dieses Tiermodell wurde gewählt, um transplantierte Stammzellen aus Wildtyp-Spendertieren mittels des enzymatischen CD26-Nachweises im Empfängerparenchym identifizieren zu können.

In Abb. 15 ist der Versuchsablauf schematisch dargestellt. 7 Wochen alte, ca. 130g schwere DPPIV<sup>-/-</sup> *F344 Fischer*-Ratten wurden nach 24 h Nahrungskarenz 3-mal mit Paracetamol (4 g/kg KG) oral behandelt. 6 h nach der letzten Paracetamolgabe erfolgte die Applikation der DPPIV<sup>+/+</sup> rMSC bzw. der PBS (Kontrollgruppe) über die Schwanzvene. Zu den Zeitpunkten 18 h und 24 h nach letzter Paracetamolgabe erfolgte die Entnahme und histologische Auswertung des Lebergewebes.

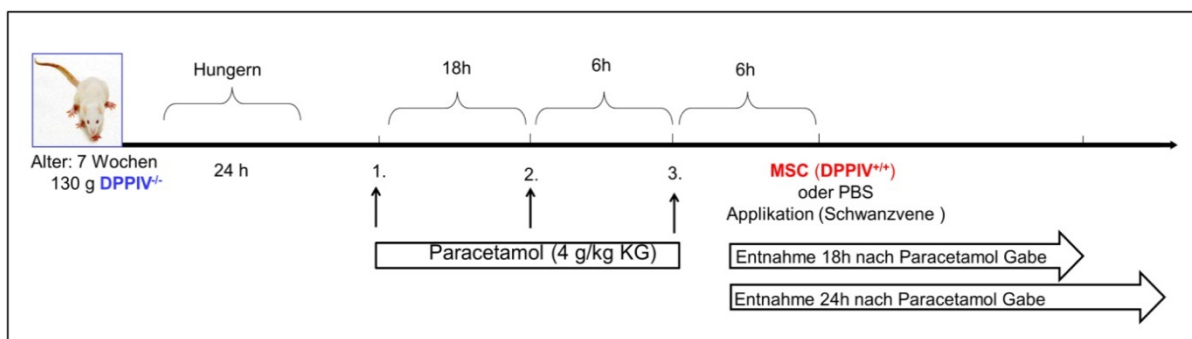


Abb.15 **Übersicht zum Versuchsverlauf zur Applikation von hMSC bei akuter Leberschädigung im Rattenmodell**

Nach 24h Nahrungskarenz erfolgte die dreimalige orale Gabe von Paracetamol (4g/kg KG). 6 h nach der letzten Paracetamolgabe erfolgte die zentralvenöse Applikation von PBS (Kontrollgruppe) oder MSC (Versuchsgruppe). Jeweils 18 h und 24 h nach der letzten Paracetamolgabe erfolgte die Leberentnahme bzw. die anschließende histologische Auswertung.

Perivenöse Bereiche wurden im Leberparenchym immunhistochemisch durch die Färbung der Glutaminsynthetase identifiziert, die in 1-2 Zellschichten um die Verzweigungen der *Vena centralis* (CV) herum exprimiert wird. Mittels Co-Lokalisation des AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) war nach Paracetamolbehandlung in den perivenösen Bereichen des Leberparenchyms die fortschreitende Apoptose der Hepatozyten nachzuweisen (Abb. 16 A, GS+AIF). In der HE-Färbung zeichneten sich deutliche Nekrosen der perivenösen

Hepatozyten anhand der geringeren Einlagerung von Eosin ins Zytoplasma ab (blassrosa gefärbt). Mit der TUNEL-Nachweismethode konnte in Parallelschnitten in diesen Bereichen umfangreiche Apoptose der Hepatozyten nachgewiesen und so die Ergebnisse der AIF-Färbung bestätigt werden (Abb. 16 A, HE und TUNEL). Die Histologie der mit PBS behandelten Tiere zeigte hingegen erwartungsgemäß eine intakte Leberarchitektur ohne Apoptose und Nekrosen (Abb. 16. B).

Die Leberschädigung durch Paracetamol war auch im Blutserum durch den Anstieg der Aspartataminotransferase (AST) um das Vierhundertfache und den Anstieg der Alaninaminotransferase (ALT) um das Zweihundertfache nachweisbar (Vergleiche Abb. 16 A mit B, Transaminasen).

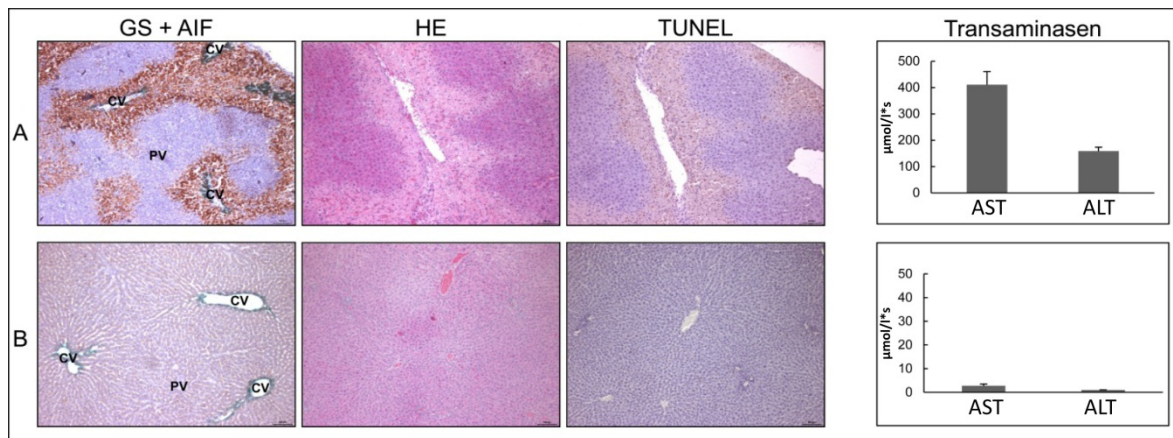


Abb.16 **Durch Paracetamol induzierter akuter Leberschaden in der Ratte**

6 h nach der letzten Gabe von Paracetamol (A) oder von PBS als Lösungsmittelkontrolle (B) wurden die Lebern entnommen und für die (Immun)histochemie an Paraffinschnitten aufgearbeitet. Gezeigt sind AIF (braun) als Apoptosemarker und GS (grün) zur Identifizierung perivenöser Hepatozyten in Doppelfärbungen. In Parallelschnitten wurden nekrotische Bereiche durch HE- und TUNEL-Färbung nachgewiesen. Veränderungen der Transaminasen AST (Aspartataminotransferase) und ALT (Alaninaminotransferase) wurden im Serum enzymatisch bestimmt ( $\mu\text{mol/l's}$ ) (oben = nach Paracetamolbehandlung; unten = Kontrolle, nach PBS Gabe). PV: Portalvene; CV: Zentralvene; AIF: *Apoptosis Inducing Factor*; GS: Glutaminsynthetase. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren.

Um die Wirkung von rMSC auf die akute Leberschädigung zu untersuchen, wurden hepatozytär differenzierte rMSC systemisch über die Schwanzvene appliziert. Diese Applikationsmethode wurde gewählt, um gleichzeitig die in der Literatur beschriebene Fähigkeit von MSC, in geschädigte Gewebe einzuwandern, („*homing*“) zu untersuchen [78].

5 Tage nach Injektion von  $1,5 \times 10^6$  rMSC über die Schwanzvene waren Stammzellen im geschädigten Lebergewebe zu finden. Der histochemische Nachweis CD26-positiver

rMSC im CD26-negativen Empfängerleberparenchym weist auf die Wanderung („*homing*“) der Stammzellen hin (Abb. 17 A). In Kontrolllebern nach Injektion von PBS anstelle von Zellen konnten erwartungsgemäß keine Stammzellen im Leberparenchym nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Die Applikation von rMSC hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Veränderungen der Serumtransaminasen AST und ALT (nicht gezeigt).

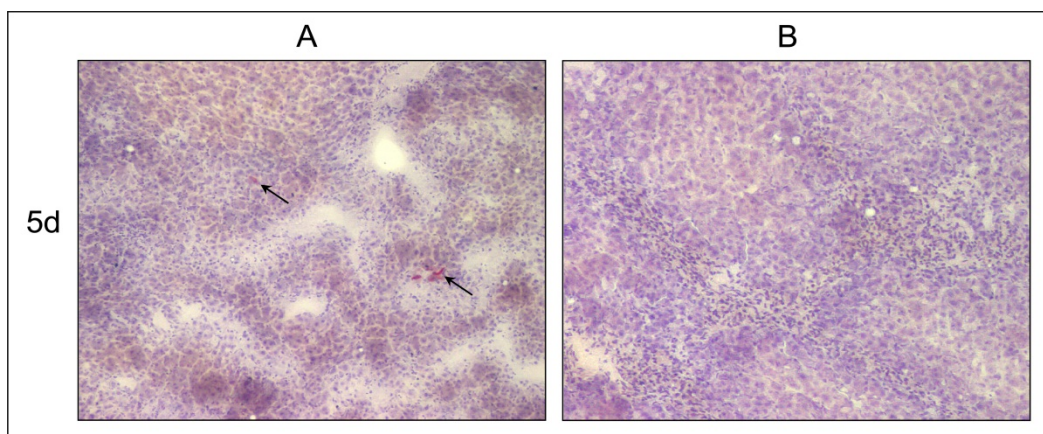
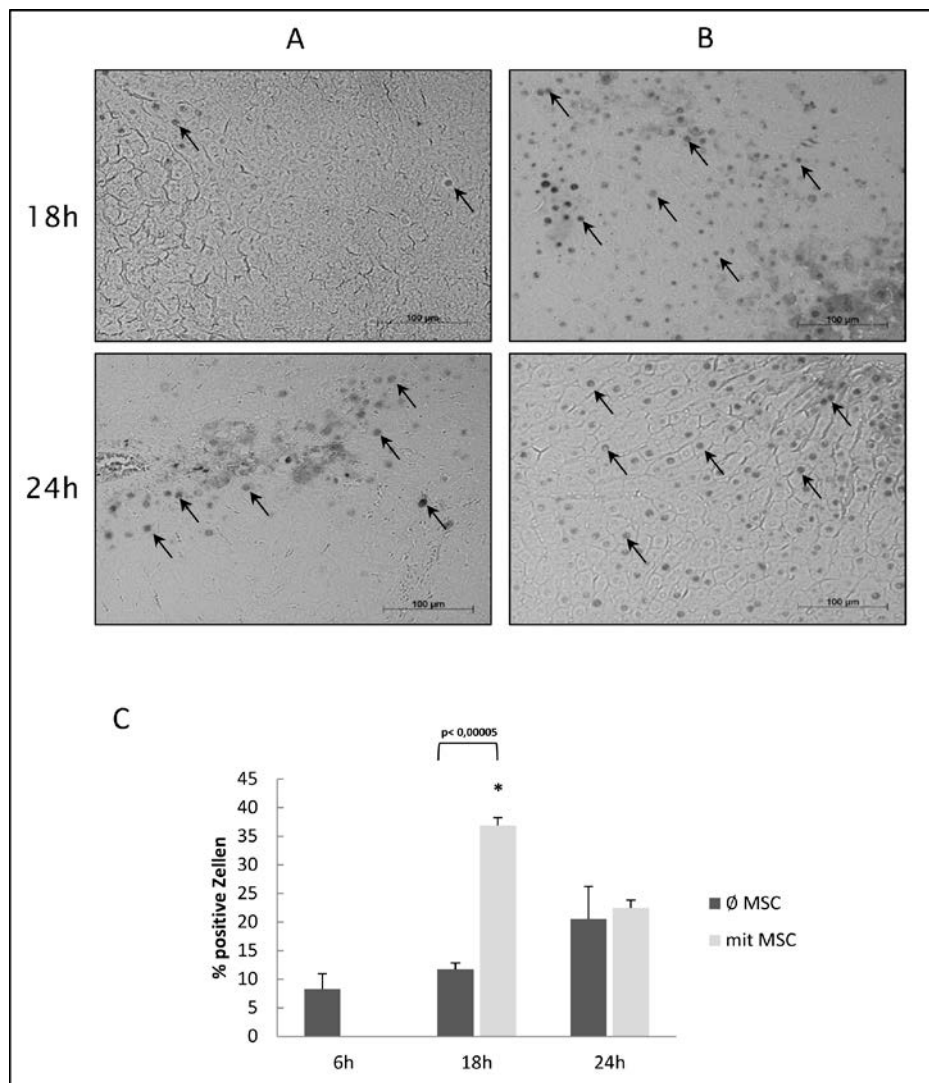


Abb.17 „*Homing*“ von rMSC in die nach Paracetamolbehandlung akut geschädigte Rattenleber 6 h nach der letzten Gabe von Paracetamol wurden  $1,5 \times 10^6$  hepatogen differenzierte rMSC (14d) (A) oder PBS als Lösungsmittelkontrolle (B) über die Schwanzvene verabreicht. 5 Tage danach wurden die Lebern entnommen und für den histochemischen Nachweis des CD 26 (rot) an Kryoschnitten aufgearbeitet. Die Pfeile weisen auf die CD26-positiven transplantierten Zellen. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren. (Vergrößerung: 100x)

Aus der Literatur ist bekannt, dass mesenchymale Stammzellen pro-proliferative Wirkung besitzen, und somit die Regeneration des geschädigten Gewebes unterstützen können. Deshalb wurde die Proliferationsrate in Lebern von mit Paracetamol behandelten Ratten bestimmt. Es wurden die Raten nach Applikation von rMSC mit der Applikation von PBS 6, 18 und 24 h nach der letzten Gabe von Paracetamol verglichen. Die basale Proliferationsrate betrug im Leberparenchym 6 h nach der letzten Paracetamolgabe 8-10 % (Abb. 18 C). 18 h nach PBS-Applikation unterschied sich die Proliferationsrate im Leberparenchym nicht signifikant von der basalen Rate (Abb. 18 C). Zu diesem Zeitpunkt war die Proliferationsrate durch die Gabe von rMSC signifikant von 10 % auf 35 % erhöht ( $n=3$ ;  $p<0,001$ ; t-Test) (Abb. 18 B vs. A (18 h) und C). 24 h nach rMSC-Applikation war die Proliferationsrate immer noch erhöht im Vergleich zur basalen Rate des Leberparenchyms, unterschied sich aber nicht signifikant von der Proliferationsrate nach PBS-Applikation (Abb. 18 B vs. A und C).

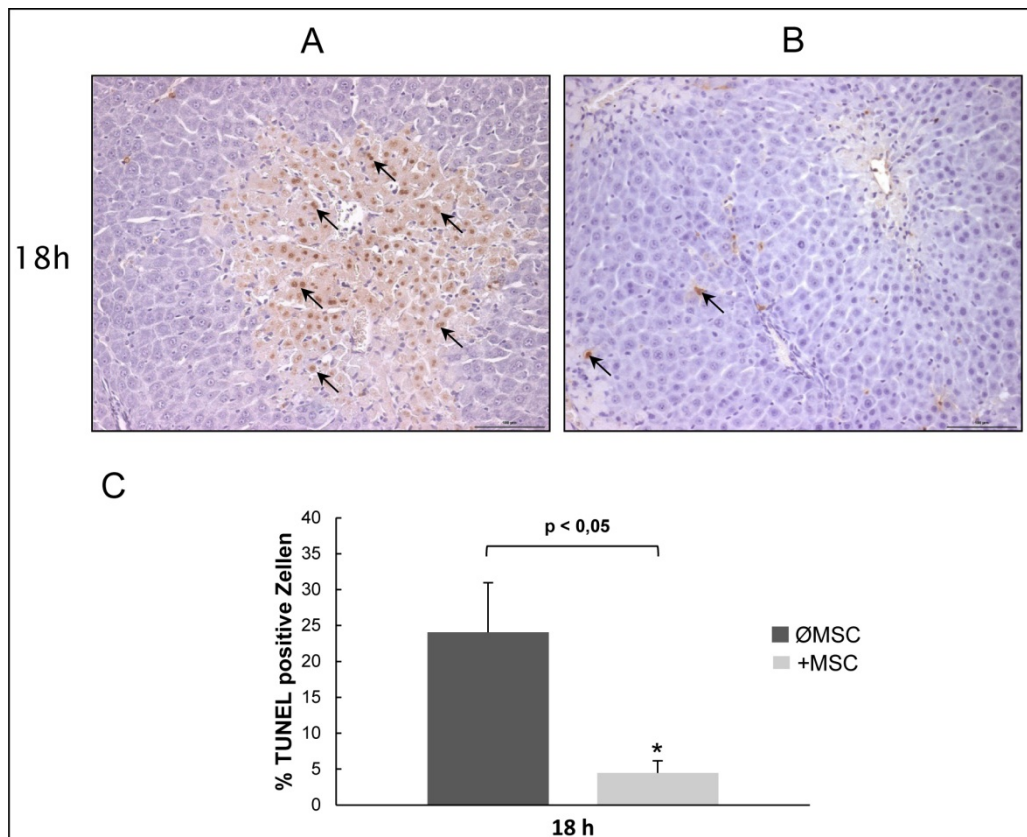




**Abb.18 Proliferationsraten im Rattenleberparenchym nach Paracetamolintoxikation**  $1,5 \times 10^6$  hepatogen differenzierte (14 d) rMSC (B) oder PBS als Lösungsmittelkontrolle (A) wurden 6 h nach letzter Paracetamolgabe über die Schwanzvene appliziert. Die Lebern wurden 6, 18 und 24 h nach der letzten Paracetamolgabe entnommen und für den immunhistochemischen Nachweis von Ki67 als Proliferationsmarker aufgearbeitet. (C) zeigt die quantitative Analyse (n=3), die durch mikroskopische Auszählung aller Zellkerne in einem mikroskopischen Feld erfolgte. Die Proliferationsrate ist als Prozent Ki67-positiver Kerne an der Gesamtanzahl gezählter Kerne ausgedrückt. Die Pfeile weisen auf die Ki67-positiven Zellkerne.

Neben der pro-proliferativen Wirkung wird in der Literatur auch eine anti-apoptotische Wirkung der Stammzellen diskutiert. Daher wurde untersucht, ob 18 h nach der Zellapplikation die Apoptoserate im durch Paracetamol geschädigten Lebergewebe durch die rMSC ebenfalls beeinflusst war. Dazu wurden  $1,5 \times 10^6$  hepatozytär differenzierte rMSC 6 h nach letzter Paracetamolgabe über die Schwanzvene appliziert und die Apoptoserate 18 h nach der letzten Paracetamolgabe mittels des TUNEL-Assays bestimmt.

Im Vergleich zu Tieren, welchen PBS als Lösungsmittelkontrolle injiziert wurde, war die Apoptoserate in Tieren, die rMSC appliziert bekamen, signifikant erniedrigt ( $n=3$ ;  $p<0,05$ ; t-Test). Sie betrug nur zirka 5 % im Vergleich zu 25 % in Kontrolltieren (Abb. 19).



**Abb.19 Apoptoserate im Rattenleberparenchym nach Paracetamolintoxikation**

$1,5 \times 10^6$  hepatogen differenzierte (14 d) rMSC (B) oder PBS als Lösungsmittelkontrolle (A) wurden 6 h nach letzter Paracetamolgabe über die Schwanzvene appliziert. Die Lebern wurden 18 h nach der letzten Paracetamolgabe entnommen und für den TUNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen aufgearbeitet. (C) zeigt die quantitative Analyse ( $n=3$ ), die durch mikroskopische Auszählung aller Zellkerne in einem mikroskopischen Feld erfolgte. Die Apoptoserate ist als Prozent TUNEL-positiver Zellkerne an der Gesamtanzahl gezählter Kerne ausgedrückt. Die Pfeile weisen auf die TUNEL positiven Zellen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass systemisch applizierte rMSC in akut durch Paracetamol geschädigtes Lebergewebe einwandern, ein Prozess, der als „Homing“ bezeichnet wird. In der geschädigten Leber wirken rMSC pro-proliferativ und anti-apoptotisch und unterstützen so die Regeneration des geschädigten Gewebes.

#### 4.5.2 Wirkung von humanen MSC (hMSC) auf die durch Paracetamol induzierte akute Leberschädigung in der Maus

In der Arbeitsgruppe ist die hepato gene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen (hMSC) aus Knochenmark etabliert. Es sollte daher in einem xenogenen Transplantationsmodell in der immundefizienten Maus nachgewiesen werden, dass humane MSC (hMSC) wie die oben beschriebenen MSC der Ratte (rMSC) gleichermaßen regeneratives Potential bei akuten Leberschädigungen aufweisen. In Abb. 20 ist der Versuchsablauf zum besseren Verständnis schematisch dargestellt. 8-12 Wochen alte *Pfp/Rag2<sup>-/-</sup>* Mäuse wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn mit Propranolol vorbehandelt. Zum Zeitpunkt 0 Tage erfolgte die Intoxikation mit Paracetamol, ein Tag später erhielt die Kontrollgruppe PBS und die Versuchsgruppe hMSC ( $1 \times 10^6$  hepatozytär differenziert (14 d)) über die Milz appliziert. Zusätzlich wurde zum Transplantationszeitpunkt eine 1/3 Hepatektomie (1/3 HT) durchgeführt. Zu den Zeitpunkten 1 Tag, 2 Tage, 3 Tage und 4 Tage nach Paracetamol-Applikation erfolgte die Analyse des entnommenen Lebergewebes.

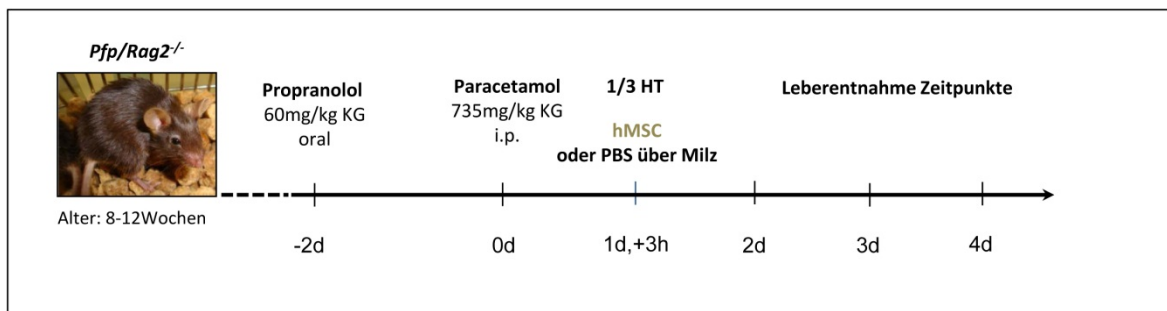
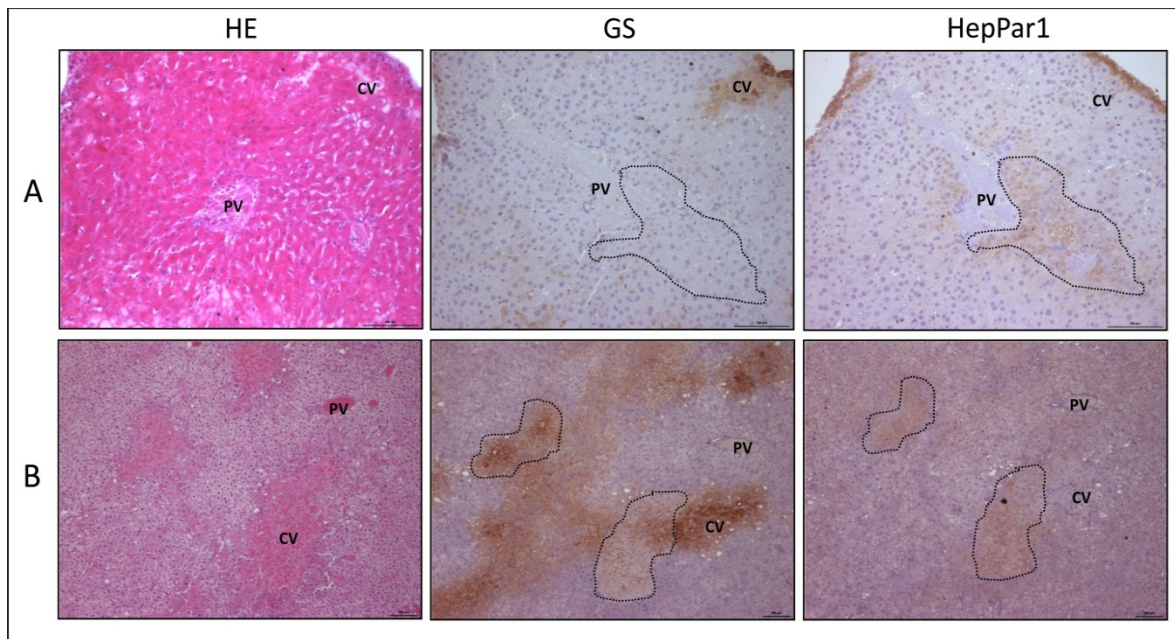


Abb.20 **Übersicht zum Versuchsverlauf zur Applikation von hMSC bei akuter Leberschädigung im Mausmodell**

Nach 2 tägiger Propranololbehandlung (60mg/kg KG) erfolgte die Behandlung mit Paracetamol (735mg/kg KG) und die Transplantation von PBS bzw. hMSC ( $1 \times 10^6$ ) über die Milz. Die Lebern wurden 1 d + 3 h, 2 d sowie 3 d und 4 d nach Paracetamolbehandlung entnommen.

Zunächst wurde die Verteilung der humanen Stammzellen in den Lebern der mit Paracetamol behandelten Mäuse untersucht. Spenderzellen konnten durch den Nachweis von HepPar1 mit einem für das humane Protein spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. 3 h nach der Transplantation wurden die Lebern entnommen und in Parallelschnitten eine HE-Färbung durchgeführt sowie die Glutaminsynthetase in perivenösen Bereichen des Leberparenchyms und HepPar1 in den hMSC immunhistochemisch nachgewiesen. Nach Injektion der Spenderzellen in einen Empfänger ohne akute Leberschädigung (PBS) waren die Zelltransplantate in periportalen Bereichen

des Leberparenchyms zu finden (Abb. 21 A). Das entspricht veröffentlichten Daten der Gruppe Yicheng [79]. Nach der Behandlung mit Paracetamol waren die Spenderzellen jedoch in perivenösen Bereichen des Parenchyms nachweisbar (Abb. 21 B). Anders als in ungeschädigten Lebern zeigten die hMSC also offensichtlich in den akut geschädigten Lebern die Neigung, in perivenöse, zerstörte Gewebereiche einzuwandern.



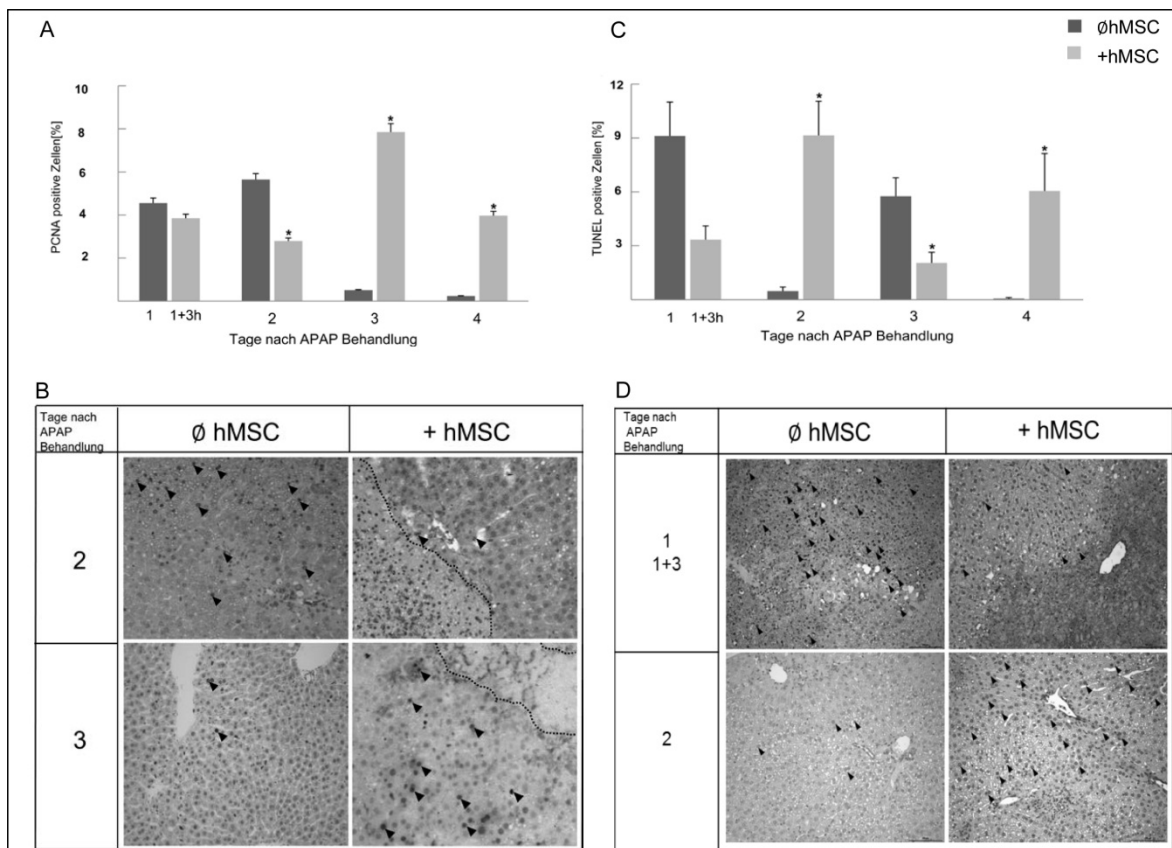
**Abb.21 Verteilung von transplantierten hMSC im Mausleberparenchym nach Paracetamolintoxikation**  
3 h nach der Zelltransplantation wurden die Lebern entnommen und in 3 aufeinanderfolgenden Schnitten die HE-Färbung durchgeführt, sowie die Glutaminsynthetase (GS) in perivenösen Leberbereichen (braun) und HepPar1 in humanen Spender-MSC (braun) nachgewiesen. Leberschnitte aus Tieren (A) ohne und (B) mit Paracetamolbehandlung. HepPar1-positive hMSC sind von einer gestrichelten Linie umgeben. PV: Portalvene; CV: Zentralvene. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren. (Vergrößerung 100 x)

Wie im Rattenmodell wurde die Wirkung der transplantierten hMSC auf Proliferation und Apoptose untersucht. Die Proliferationsrate wurde mittels immunhistochemischen Nachweises von PCNA und die Apoptoserate mittels TUNEL-Test nachgewiesen.

Die Proliferationsrate in Lebern aus mit hMSC behandelten Tieren war 3 und 4 Tage nach Paracetamolbehandlung im Vergleich zu Kontrolltieren, die PBS statt Zellen erhalten hatten, signifikant erhöht ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ; t-Test) (Abb. 22 A).

Der Verlauf der Apoptoserate war uneinheitlich. Sie war in den Versuchstieren mit hMSC-Applikation 3 h nach Zellgabe im Vergleich zu Kontrolltieren erniedrigt. Zwei Tage nach Paracetamolbehandlung hingegen stieg sie signifikant ( $n=3$   $p < 0,05$ ; t-Test) von zirka 2 % auf 10 % an. Drei Tage nach der Paracetamolbehandlung war die Apoptoserate in Lebern nach Zelltransplantation (mit 3 %) signifikant ( $n=3$ ,  $p<0,05$ ; t-Test) geringer als in Lebern aus mit PBS behandelten Kontrolltieren (7%) (Abb. 22 C und D).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über die Milz applizierte hMSC in akut durch Paracetamol geschädigtes Lebergewebe einwandern, sie sind nicht wie in ungeschädigten Lebern in periportalen Bereichen zu finden, sie wandern direkt in die durch Paracetamol geschädigten perivenösen Bereiche der Leber ein und wirken dort pro-proliferativ und anti-apoptotisch und unterstützen so die Regeneration des geschädigten Gewebes.



**Abb.22 Proliferations- und Apoptoserate im Mausleberparenchym nach Paracetamolintoxikation**

24 h nach Paracetamolgabe (1) wurden  $1 \times 10^6$  hepatogen differenzierte (14 d) hMSC oder PBS als Lösungsmittelkontrolle ( $\emptyset$ hMSC) über die Milz appliziert. Die Lebern wurden 3 h (1+3h Tage), 24 h (2 Tage), 48 h (3 Tage) und 72 h (4 Tage) nach der Zellgabe entnommen und für den immunhistochemischen Nachweis des Proliferationsmarkers PCNA (A und B) sowie für den TUNEL-Assay zum Nachweis apoptotischer Zellen (C und D) aufgearbeitet. (A) und (C) zeigen die quantitative Analyse, die durch mikroskopische Auszählung aller Zellkerne in einem mikroskopischen Feld erfolgte. Die Raten sind als Prozent positiver Zellkerne an der Gesamtanzahl gezählter Kerne ausgedrückt. Insgesamt wurden jeweils 10 Schnitte aus je 3 Tieren ausgezählt. Vergrößerung: 100 x

#### 4.6 Applikation von mesenchymalen Stammzellen (rMSC) bei chronischer Leberschädigung im Rattenmodell

Nachdem in unterschiedlichen Tiermodellen der akuten Leberschädigung das regenerationsfördernde Potential von MSC sowohl der Ratte als auch des Menschen gezeigt wurde, wurde in weiteren Tiermodellen die Wirkung von MSC auf chronische

Lebererkrankungen untersucht. Ein häufig verwendetes und etabliertes Modell ist die Induktion der Leberzirrhose in der Ratte durch Behandlung mit Tetrachlorkohlenstoff ( $\text{CCl}_4$ ). In der vorliegenden Arbeit wurde dazu wiederum das Modell der CD26-defizienten ( $\text{DPPIV}^{-/-}$ ) Ratte ausgewählt, da transplantierte Spenderzellen einfach histochemisch auf Kryoschnitten im Empfängerparenchym nachgewiesen werden können. Abb. 23 stellt den Versuchsablauf schematisch dar. 5 Wochen alte  $\text{DPPIV}^{-/-}$  *F344 Fischer*-Ratten wurden für 12 Wochen mit  $\text{CCl}_4$  und Phenobarbital behandelt. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte bei einer Versuchsgruppe die Applikation von  $\text{DPPIV}^{+/+}$  rMSC über die Schwanzvene. Die zweite Versuchsgruppe bekam als Kontrolle PBS über die Schwanzvene injiziert. Zu den Zeitpunkten 5 Tage, 3 Wochen und 10 Wochen nach Zell- bzw. PBS-Applikation erfolgte die Analyse des Blutserums und der Leberproben.

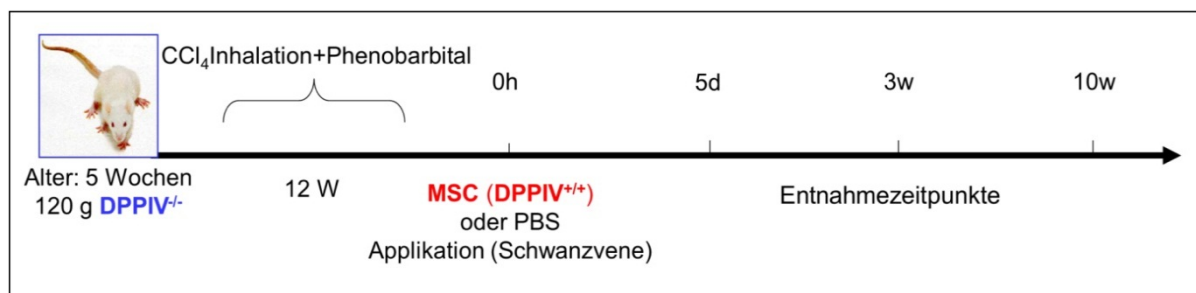


Abb.23 **Übersicht des Versuchsverlaufs der Applikation von rMSC bei chronischer Leberschädigung im Rattenmodell**

Nach 12 Wochen  $\text{CCl}_4$ - und Phenobarbitalbehandlung erfolgte die Applikation von rMSC bzw. PBS zum Zeitpunkt 0 h. Zu den Entnahmezeitpunkten 5 Tage (5 d), 3 Wochen (3 w) und 10 Wochen (10 w) erfolgte die Analyse der Blutserumwerte und der Leberproben.

Die  $\text{CCl}_4$ -Behandlung verursachte in den CD26-negativen *F344 Fischer*-Ratten einen chronischen Leberschaden, der deutlich am fibrotischen Umbau des Leberparenchyms zu erkennen war (Abb. 24). Typisch sind die entstandenen Regeneratknoten (*Pseudolobuli*), die in den HE-Färbungen an Tag 5 (Abb. 24, 5d), 3 Wochen (Abb. 24, 3w) und 10 Wochen (Abb. 24, 10w) nach Abschluss der  $\text{CCl}_4$ -Behandlung gut zu erkennen waren. Diese sind durch Kollagensepten abgetrennt, die durch Sirius red-Färbung während desselben Zeitraums darstellbar waren (Abb. 24, Sirius red). Wie im Modell des akuten Leberversagens wurden hepatozytär differenzierte (14 d) rMSC nach Beendigung der  $\text{CCl}_4$ -Behandlung (0 h) über die Schwanzvene systemisch appliziert. Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnten CD26-positive Spender-rMSC im CD26-negativen Empfängerparenchym nachgewiesen werden. Dabei kam es zur Einwanderung („*Homing*“) der rMSC in die Regeneratknoten der fibrotisch veränderten Leber. Die Größe der Spenderzellcluster wuchs in diesem Zeitraum von 1-3 Spenderzellen am Tag 5 auf 5-8

Spenderzellen nach 10 Wochen an (Abb. 24 A-C, CD26). Kontrollen ohne Zellapplikation wurden durchgeführt, sind hier aber nicht gezeigt, da sich Veränderungen lediglich in der Darstellung der Kollagenfasern ergab, welche später gezeigt wird (Abb. 27).

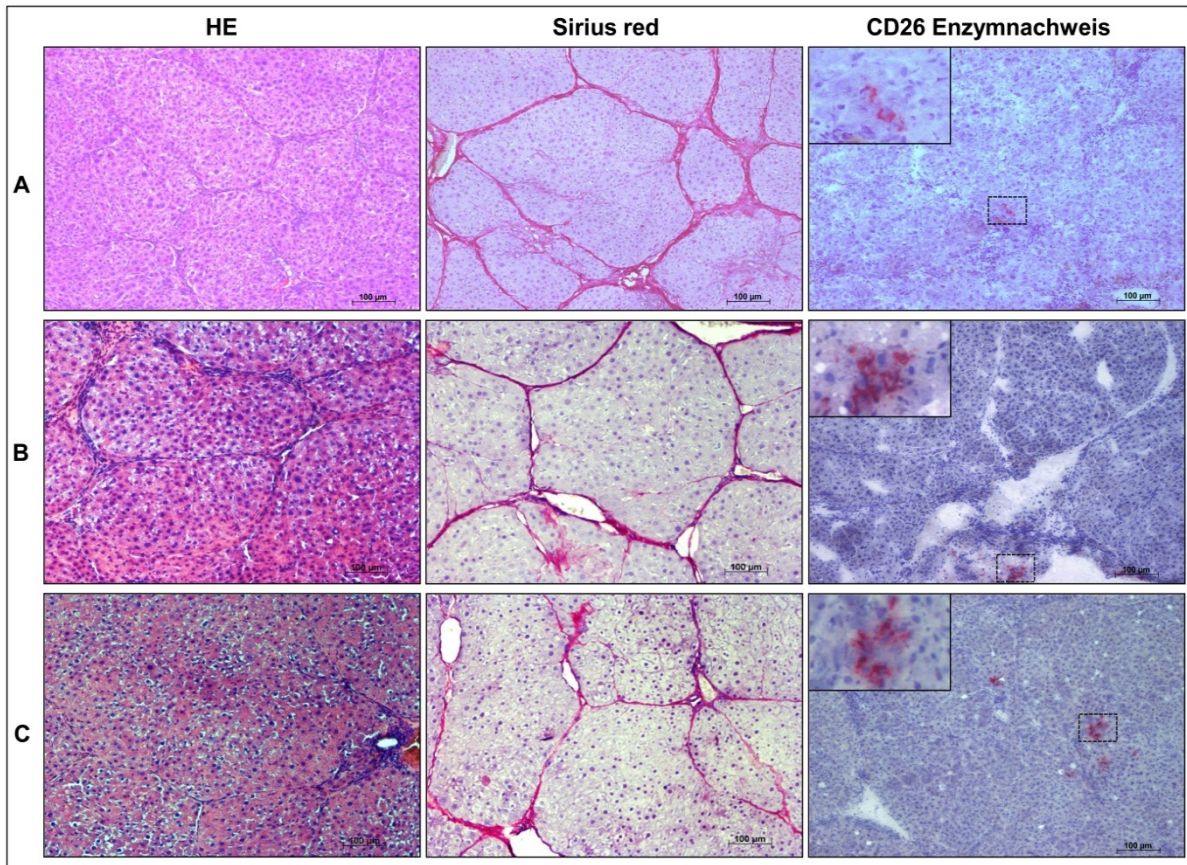


Abb.24 „Homing“ von rMSC in die nach  $\text{CCl}_4$ -Behandlung chronisch geschädigte Rattenleber

In der HE-Färbung (links) sind deutlich die Regeneratknötchen am 5. Tag (A), 3 Wochen (B) und 10 Wochen (C) nach Transplantation von rMSC zu erkennen. Die Sirius red-Färbung (Mitte) zeigt am Paraffinschnitt die die Knoten umgebenden Kollagenfasern. Die am Tag 0 über die Schwanzvene applizierten hepatozytär differenzierten (14 d) rMSC wurden 5 Tage und 3 bzw. 10 Wochen nach Zelltransplantation anhand des enzymatischen CD26-Nachweises (rot) am Kryoschnitt dargestellt. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus jeweils 3 Tieren. (Vergrößerung 100 x)

Die histopathologischen Veränderungen der Leberarchitektur bewirken durch das vermehrte Absterben von Hepatozyten einen teilweisen Funktionsverlust, der nicht durch die Regeneration gesunder Hepatozyten ersetzt werden kann. Zu den klinischen Parametern, die in der Zirrhose typischerweise verändert sind, zählen die Blutgerinnung (INR), die bei Leberschädigung vermindert ist (=erhöhter INR), das Bilirubin, das normalerweise in der gesunden Leber glucuronidiert und über die Galle ausgeschieden wird, in der kranken Leber aber durch den Untergang von Hepatozyten unkonjugiert ins Blut abgegeben wird und schließlich das Plasmaprotein Albumin, das bei einem Leberschaden auf Grund zugrunde gehender Hepatozyten vermindert sezerniert wird. Der

INR war gegenüber unbehandelten Tieren nach Abschluss der CCl<sub>4</sub>-Behandlung drei- bis vierfach erhöht (Abb. 25 A, 0d). Bereits 5 Tage nach rMSC- oder PBS-Injektion war der INR-Wert wieder auf den Normwert von ca. 1 gesunken. Dabei unterschieden sich die Werte zwischen rMSC- oder PBS-behandelten Tieren nicht signifikant (n=3, p > 0,05; t-Test). Die Albuminmengen im Serum war zwar nach Abschluss der CCl<sub>4</sub>-Behandlung aufgrund der Schädigung der Hepatozyten durch die Behandlung leicht erniedrigt, erreichte aber bereits nach 5 Tagen wieder den Normwert von 35-40 g/l (Abb. 25 B). Die Gesamt-Bilirubin-Werte wurden durch die CCl<sub>4</sub>-Behandlung leicht, aber nicht signifikant erhöht und blieben durch die Behandlung mit rMSC unbeeinflusst (Abb. 25 C). Lediglich 10 Wochen nach Applikation der rMSC konnte ein erhöhter Wert des gesamt-Bilirubins gemessen werden. Dieser korrelierte mit dem Abfall des Albumins zum selben Zeitpunkt. Dafür gibt es im Prinzip zwei Erklärungen. Im Falle der erhöhten renalen Ausscheidung (Albuminurie) würde der Abfall des Albumins, das im Blut zum Transport von lipophilen Substanzen benötigt wird, sekundär zum Anstieg des ebenfalls lipophilen Bilirubins führen. Als zweite Möglichkeit wäre erneut eine verminderte Konjugation als Folge einer auftretenden Hepatozinschädigung anzunehmen. In diesem Fall wäre auch die Albuminsynthese vermindert. Für beide Möglichkeiten gab es phänotypisch keine Evidenz, so dass es für dieses Ergebnis derzeit keine plausible Erklärung gibt. Eine Nierenschädigung kann ausgeschlossen werden, da die veterinärpathologische Untersuchung der Nieren keinen Befund ergab. Auch die HE-Färbung zeigte zwar noch Reste der Zirrhose, jedoch keine weitgehende Leberschädigung (Abb. 24, unten links). Zusammenfassend kann man also sagen, dass durch das Absetzen der CCl<sub>4</sub>-Behandlung bereits eine Verbesserung der klinisch erfassbaren Leberfunktion eintrat, die durch die Transplantation von Stammzellen nicht weiter oder schneller verbessert wurde.



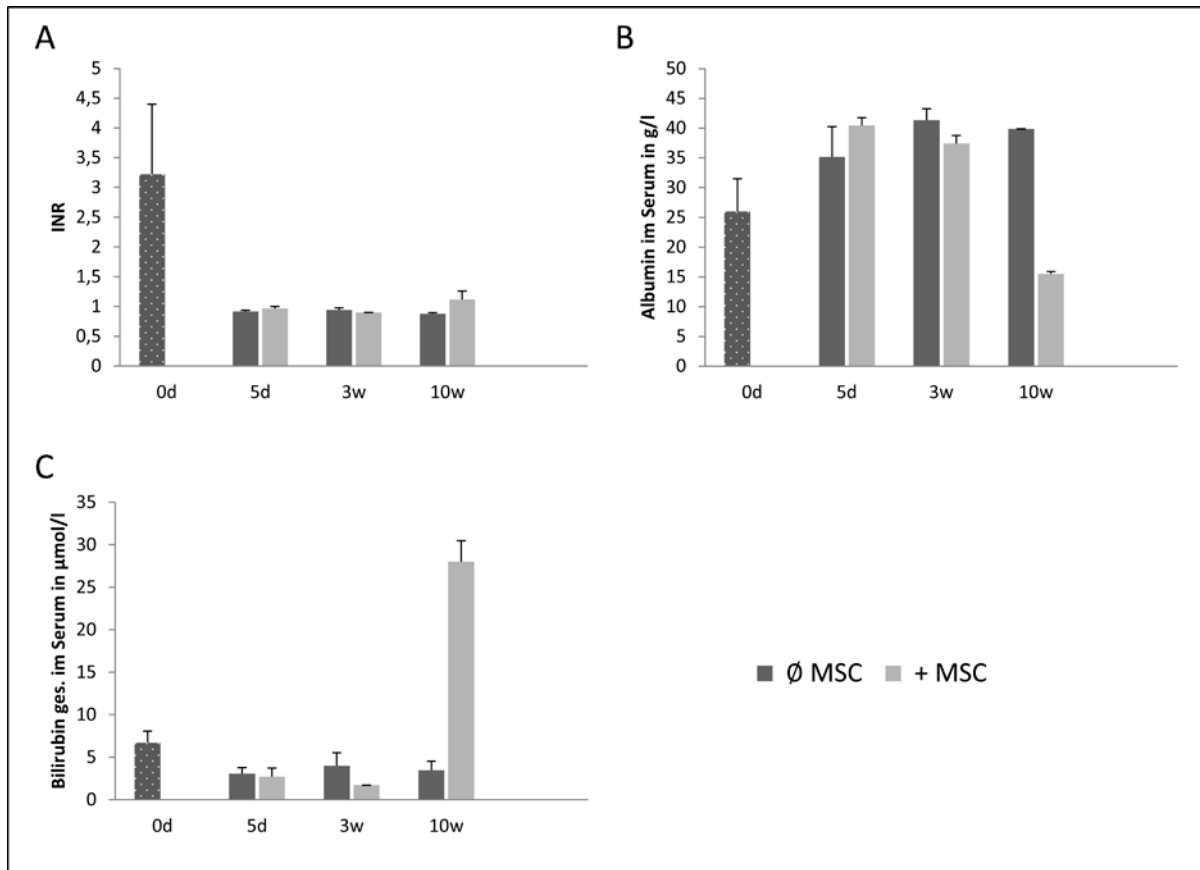


Abb.25 **Klinisch relevante Serumwerte in Ratten nach CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberzirrhose**

Vergleich der Serumwerte (A) INR, (B) Albumin und (C) Gesamt-Bilirubin nach Induktion der Leberzirrhose durch CCl<sub>4</sub> (gepunktet, 0d). Zu diesem Zeitpunkt wurde die Behandlung mit CCl<sub>4</sub> abgebrochen und die Tiere entweder mit hepatogen differenzierten rMSC (14d) (hellgrau) oder mit Lösungsmittel (PBS) behandelt (dunkel grau) und 5 Tage, 3 Wochen und 10 Wochen nach Injektion weiter beobachtet. n=3

Eine Konsequenz aus dem Gewebeumbau bei Leberzirrhose ist die Minderdurchblutung der Leber aufgrund des erhöhten Gefäßwiderstandes in der Leber (portale Hypertension). Dadurch bilden sich Umgehungskreisläufe, die wiederum eine Vergrößerung der Milz zur Folge haben. Die Vergrößerung der Milz, die anhand ihres Gewichtes quantitativ erfasst werden kann, ist also ein indirektes Maß zur Feststellung der Leberzirrhose und der portalen Hypertension. Es konnte gezeigt werden, dass die CCl<sub>4</sub>-Behandlung der Versuchstiere zu einer Vergrößerung der Milz (Splenomegalie) führte. Im Vergleich betrug das Milzgewicht un behandelter Versuchstiere nur circa 0,8 g gegenüber 1,4-1,6 g nach Beendigung der CCl<sub>4</sub>-Behandlung (Abb. 26, 0 d). 5 Tage nach der rMSC- bzw. PBS-Applikation waren die Milzgewichte bereits wieder leicht erniedrigt, aber noch über den Normwert erhöht. Es zeigte sich, dass nach Applikation von rMSC die Milzgewichte nach 5 Tagen und 3 Wochen signifikant (5d: n=3 p < 0,05; 3w: n=3 p < 0,05; t-Test) niedriger waren als die Milzgewichte der Tiere ohne Stammzellbehandlung (PBS-Applikation).

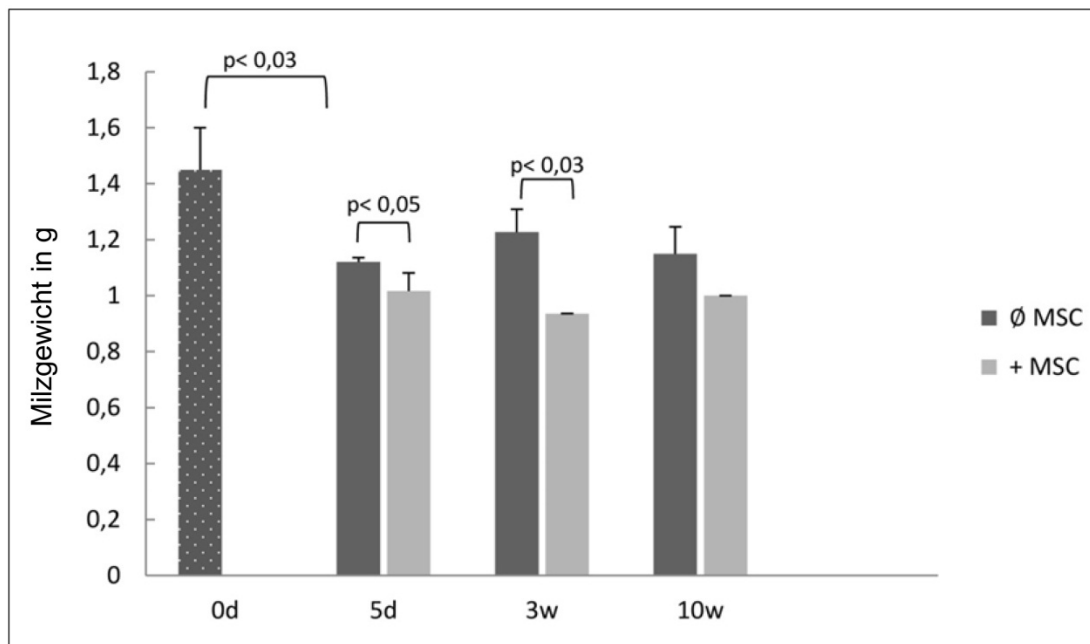


Abb.26 **Milzgewichte in Ratten nach CCl<sub>4</sub>-induzierter Leberzirrhose als Indikator der portalen Hypertension**

Vergleich der Milzgewichte nach Induktion der Leberzirrhose durch CCl<sub>4</sub> (0 d) mit den Gewichten nach der Transplantation von hepatogen differenzierten rMSC (14 d) (hellgrau) und mit Lösungsmittel (PBS) injizierten Ratten (dunkelgrau) 5 Tage, 3 Wochen und 10 Wochen nach Injektion. Zum Vergleich: Das Milzgewicht einer gesunden Ratte beträgt  $0,8 \pm 0,05$  g. n=3

Die signifikante Gewichtsverringerung der Milz nach Stammzellapplikation ließ auf eine Verbesserung der portalen Hypertension schließen. Da diese ursächlich mit der ins Lebergewebe eingelagerten Menge an Kollagen korreliert, wurde die Kollagenmenge mittels quantitativer Auswertung von mit Sirius red gefärbten Gewebeschnitten erfasst.

Nach Beendigung der Behandlung mit CCl<sub>4</sub> wurden systemisch entweder hepatogen differenzierte (14 d) rMSC (Abb. 27 B) oder PBS als Lösungsmittelkontrolle (Abb. 27 A) in die Schwanzvene injiziert. Zu den Zeitpunkten 0 Tage, 5 Tage, 3 Wochen und 10 Wochen nach Applikation wurden die Lebern entnommen, Paraffinschnitte mit Sirius red gefärbt und die Kollagenmenge mit Hilfe der Software Image J in Pixeln Kollagen je Pixel gesamt quantifiziert. Nach Abschluss der CCl<sub>4</sub>-Behandlung (0 d) war die Kollageneinlagerung erhöht. Danach fiel die Kollagenmenge in mit PBS behandelten Lebern zwar tendenziell wieder ab, war aber zu keinem Zeitpunkt gegenüber dem Zeitpunkt 0 d signifikant erniedrigt. Demgegenüber waren die Mengen in mit rMSC behandelten Lebern mit Ausnahme des Zeitpunktes 3 Wochen signifikant gegenüber dem Ausgangswert (0 d) erniedrigt. 5 Tage und 10 Wochen nach rMSC-Applikation war

signifikant ( $p < 0,02$ ; t-Test) weniger Kollagen im Leberparenchym bestimmbar als in Lebern der mit PBS behandelten Kontrolltiere (Abb. 27 C).

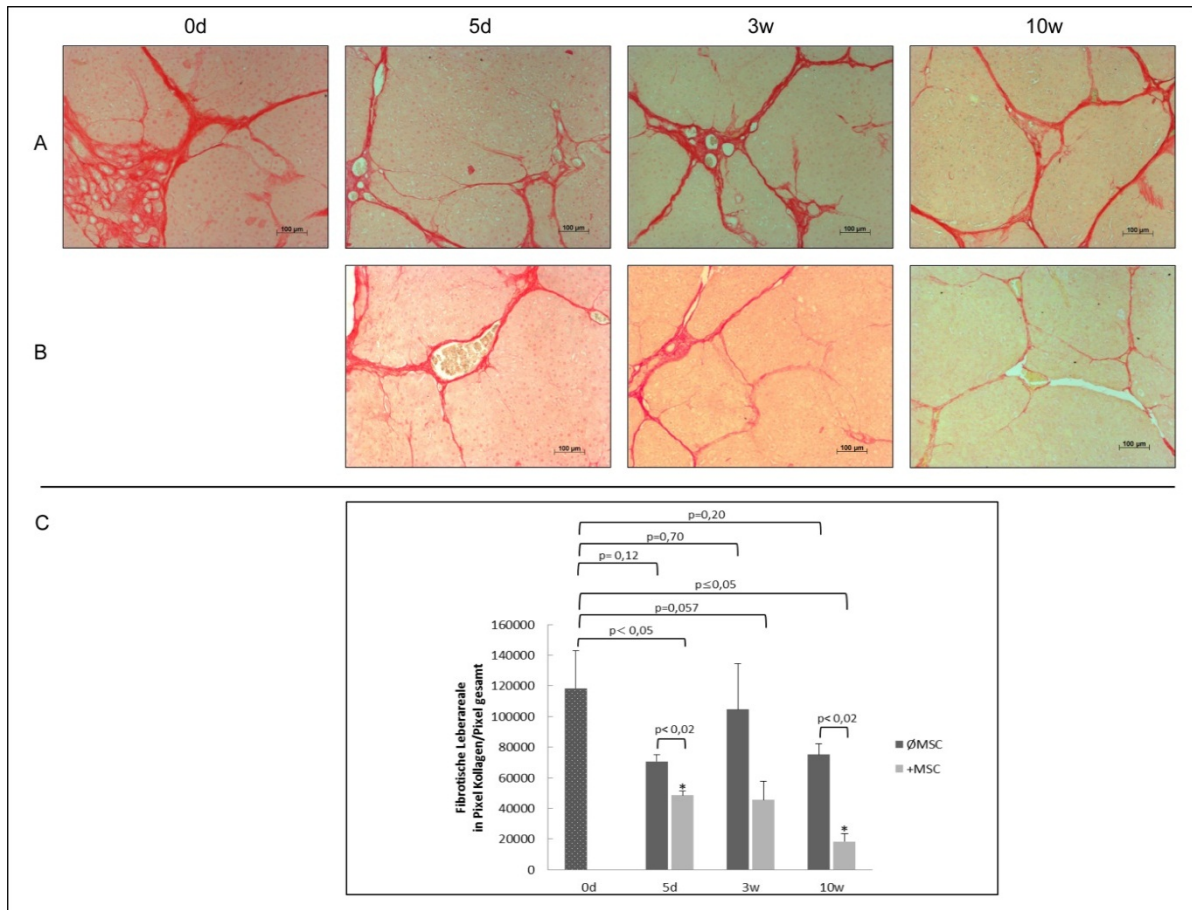


Abb.27 Quantifizierung des Leberkollagengehaltes nach  $\text{CCl}_4$  induzierter chronischer Leberschädigung mit (B) und ohne systemischer rMSC Applikation (A)

Gezeigt sind unter A und B die Sirius red-Färbungen am Paraffinschnitt zur Darstellung der Kollagenfasern. (C) zeigt die quantitative Erfassung der fibrotischen Leberareale in Pixel Kollagen je Pixel gesamt. Dazu wurde die Software ImageJ verwendet. Dargestellt sind jeweils die Zeitpunkte 0 Tage, 5 Tage, 3 Wochen und 10 Wochen nach rMSC Transplantation.  $n=3$

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Stammzellbehandlung der Ratten mit Leberzirrhose zwar zu keiner signifikant verbesserten Leberfunktion jedoch zu einer signifikant verbesserten Hämodynamik aufgrund verminderter Kollageneinlagerungen führte. Die Daten zeigen deutlich, dass die rMSC anti-fibrotisch wirkten.

## 4.7 Isolierung und Charakterisierung der hepatogenen Differenzierungsfähigkeit von mesenchymalen Stammzellen aus dem Schwein

Das Schwein bildet sowohl anatomisch als auch physiologisch die Situation beim Menschen besser ab als Nager wie Maus und Ratte. Um die Übertragbarkeit vom Nager auf das Schweinmodell zu zeigen, wurden im letzten Abschnitt der Arbeit mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (pBM-MSc) und dem viszeralen- (pATvis-MSc), bzw. subkutanen (pATsub-MSc) Fettgewebe des Schweines isoliert und charakterisiert bzw. ihre hepatogenen Eigenschaften nach Differenzierung untersucht. Der Vergleich der mesenchymalen Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben sollte klären, ob sich porcine MSc grundsätzlich in Hepatozytenähnliche Zellen differenzieren lassen bzw. sich hinsichtlich ihrer Differenzierungsfähigkeit unterscheiden. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse sollte entschieden werden, welcher MSc-Typ sich am besten für spätere Transplantationsexperimente im Großtiermodell eignete.

### 4.7.1 Durchflusszytometrische Analyse ausgewählter Oberflächenmoleküle

Das in der Arbeitsgruppe für MSc aus Nagern verwendete Protokoll wurde auf die Isolierung von MSc des Schweines übertragen. Die gewonnenen Zellfraktionen aus dem Knochenmark und aus dem viszeralen und subkutanen Fettgewebe wiesen neben der Eigenschaft der Plastikadhärenz als typischem Merkmal mesenchymaler Stammzellen kaum Kontaminationen durch hämatopoetische Zellen auf. Dies konnte durch die mittels FACS durchgeführte Bestimmung der hämatopoetischen Oberflächenmoleküle CD14 (pBM-MSc:  $5,16 \pm 3,46$  %; pATsub-MSc:  $0,66 \pm 0,49$  %; pATvis-MSc:  $1,20 \pm 0,23$  %) und CD45 (pBM-MSc:  $0,60 \pm 0,10$  %; pATsub-MSc:  $2,36 \pm 0,66$  %; pATvis-MSc:  $4,33 \pm 0,66$  %) gezeigt werden. Hingegen waren in allen 3 MSc-Typen die mesenchymalen Oberflächenmoleküle CD44 (pBM-MSc:  $99,9 \pm 0,01$  %; pATsub-MSc:  $95,16 \pm 0,66$  %; pATvis-MSc:  $99,40 \pm 4,58$  %), CD90 (pBM-MSc:  $99,8 \pm 0,1$  %; pATsub-MSc:  $91,70 \pm 0,35$  %; pATvis-MSc:  $99,50 \pm 8,05$  %), CD105 (pBM-MSc:  $83,76 \pm 8,83$  %; pATsub-MSc:  $71,13 \pm 9,96$  %; pATvis-MSc:  $80,03 \pm 13,20$  %) und CD29 (pBM-MSc:  $99,73 \pm 0,03$  %; pATsub-MSc:  $98,70 \pm 0,08$  %; pATvis-MSc:  $99,76 \pm 0,96$  %) hoch exprimiert (Abb. 28). Multiples Differenzierungspotential ist eine weitere Eigenschaft von Stammzellen. Dieses wurde mit porcinen MSc getestet, indem die Zellen unter Kulturbedingung zur Förderung adipogener, osteogener und hepatogener Eigenschaften kultiviert wurden. Nach 21 Tagen hepatogener Differenzierung konnte für CD105 eine

signifikante ( $p \leq 0,05$ ; t-Test) Verringerung der Expression in den 3 unterschiedlichen MSC-Typen im Vergleich zu undifferenzierten MSC gezeigt werden (pBM-MSC:  $12,4 \pm 12,00$  %; pATsub-MSC:  $11,66 \pm 5,72$  %; pATvis-MSC:  $6,30 \pm 3,96$  %) (Abb. 28 A vs. B). Alle anderen untersuchten mesenchymalen Marker blieben durch die Differenzierung unverändert.

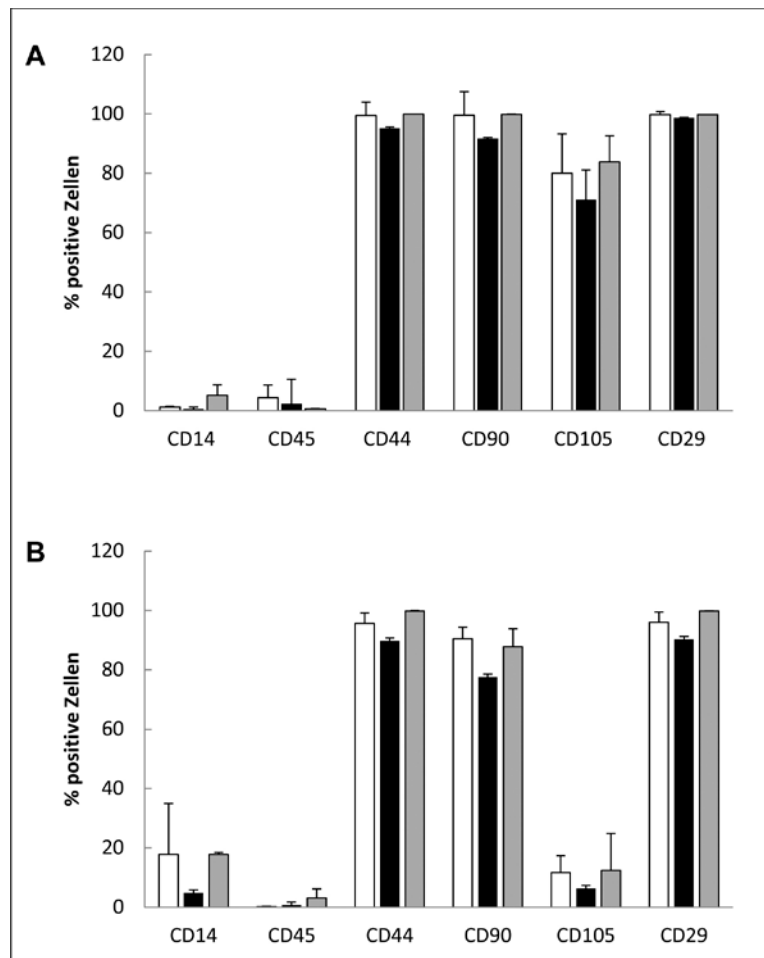


Abb. 28 Durchflußzytometrische Analyse von undifferenzierten (A) und 21 Tagen hepatogen differenzierten (B) porcinen MSC

Die hämatopoetischen (CD14, CD45) und mesenchymalen (CD44, CD90, CD105, CD29) Oberflächenmoleküle von porcinen MSC aus dem subkutanen Fettgewebe (schwarz), dem viszeralen Fettgewebe (weiß) und dem Knochenmark (grau) wurden durchflußzytometrisch bestimmt und sind hier als % positive Zellen von der gesamt Zellfraktion aufgetragen. Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Zellpräparationen bestimmt.

#### 4.7.2 Multiple Differenzierungsfähigkeit

Die multiple Differenzierungsfähigkeit stellt ein wesentliches Merkmal von mesenchymalen Stammzellen dar. Hier wurden zunächst die adipogene und osteogene Differenzierung getestet. Nach 7 Tagen adipogener Differenzierung konnten mittels SUDAN III Lipidakkumulationen sowohl in MSC aus viszeralem (Abb. 29 B) und

subkutanem (Abb. 29 A) Fettgewebe als auch in MSC aus Knochenmark nachgewiesen werden (Abb. 29 C). Nach 7 Tagen osteogener Differenzierung konnte ebenfalls in den MSC aus allen 3 Geweben die Aktivität der alkalischen Phosphatase mittels BCIP nachgewiesen werden. Im Vergleich war die Aktivität in porcinen MSC aus Knochenmark am höchsten (Abb. 29 BCIP C vs. A und B).

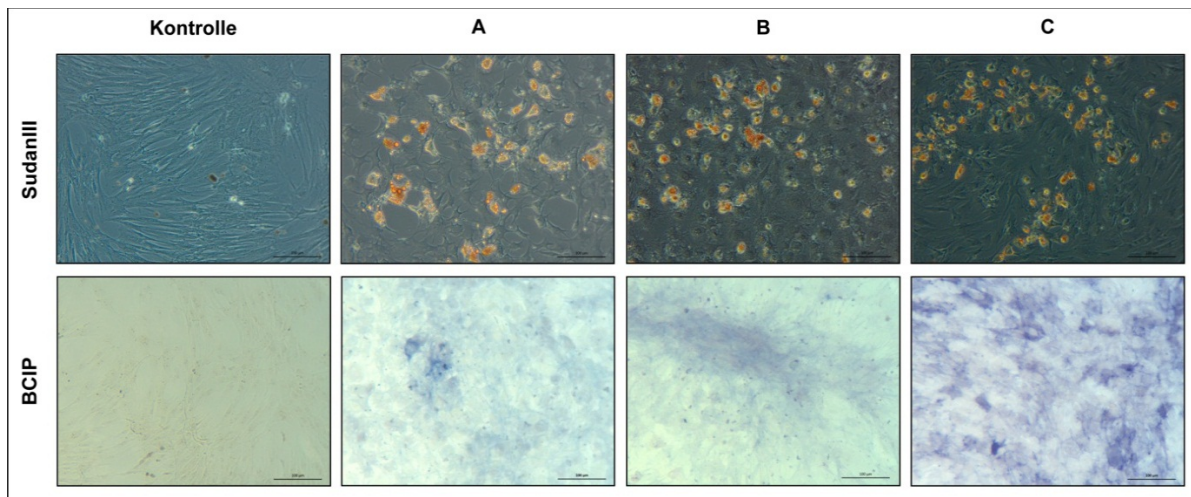


Abb.29 **Multiples Differenzierungspotential von porcinen MSC**

Die MSC aus den unterschiedlichen Ursprungsgeweben subkutanen (A) und viszerales Fettgewebe (B) und Knochenmark (C) wurden 7 Tage im adipogenen oder osteogenen Differenzierungsmedium kultiviert und die Differenzierung in adipozytäre bzw. osteozytäre Zellen mittels Sudan III (Lipideinlagerungen) oder BCIP (alkalische Phosphatase) nachgewiesen. Undifferenzierte porcine MSC wurden als Kontrolle verwendet. Gezeigt sind repräsentative Bilder aus 3 unabhängigen Zellpräparationen.

#### 4.7.3 Hepatozytäre Differenzierung von MSC: Änderung der Zellmorphologie und Glykogeneinlagerung

Die MSC aus allen drei Geweben änderten ihre Morphologie von spindelförmig, fibroblastenartig im undifferenzierten Zustand zu einer eher polygonalen Form nach 21 Tagen hepatogener Differenzierung (Abb. 30, 21 d), die typisch für primäre porcine Hepatozyten ist (Vergleiche Abb. 30 A-C mit D). Des Weiteren wiesen einige MSC nach der hepatozytären Differenzierung mehr als einen Zellkern auf. Auch das ist ein wesentliches Merkmal von primären Hepatozyten in der Kultur (Abb. 30 D).

Die Aufrechterhaltung der Glucosehomöostase bei unterschiedlichen ernährungsphysiologischen Bedingungen ist eine wichtige metabolische Funktion der Leber. So synthetisieren und speichern die Hepatozyten bei hohem Glucoseangebot Glykogen. Um diese wichtige hepatozelluläre Funktion an den hepatogen differenzierten porcinen MSC qualitativ nachzuweisen, wurde eine PAS Färbung zur Detektion von intrazellulären Polyglykanen wie Glykogen durchgeführt. Bereits am Tag 7 der hepatogenen Differenzierung waren deutlich Glykogeneinlagerungen in den hepatozyten-

ähnlichen Zellen aus den unterschiedlichen Ursprungsgeweben nachweisbar (Abb. 30 A, B und C, 7d PAS). Die Intensität der Glykogeneinlagerung in den hepatozytär differenzierten Zellen entsprach der Glykogeneinlagerung von primären porcinen Hepatozyten (Abb. 30 D, PAS) am Tag 2 der Kultur im Hepatozyten-Erhaltungsmedium. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf den Erwerb von hepatozytären Funktionen der porcinen MSC aus den verschiedenen Ursprungsgeweben nach der hepatogenen Differenzierung.

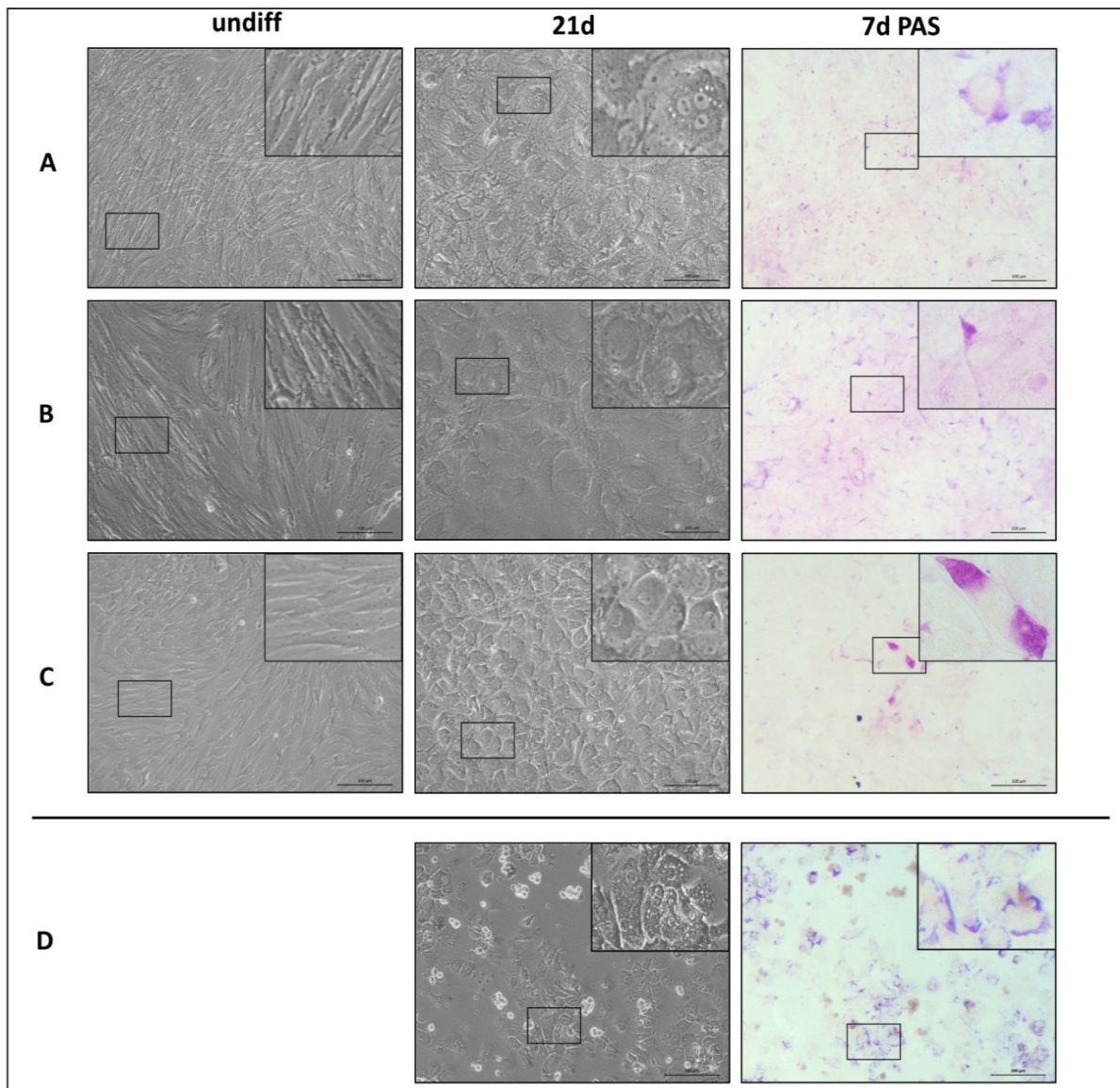


Abb. 30 Vergleich der Zellmorphologie und der Glykogeneinlagerung von porcinen MSC aus subkutanem, (A) und viszeralem Fettgewebe (B) sowie aus Knochenmark (C) nach hepatogener Differenzierung

Die porcinen MSC aus den unterschiedlichen Geweben wurden für 21 Tage hepatogen differenziert. Die Phasenkontrastaufnahmen der Zellkultur (A, B und C, undiff und 21d) zeigen die Veränderung der Zellmorphologie von spindelförmig (undifferenziert) zu polygonal (21d differenziert). Nach 7 Tagen hepatogener Differenzierung wurde Glykogen mittels der PAS-Reaktion (A, B und C, 7d PAS) nachgewiesen. Zum Vergleich zeigt (D) 2 Tage kultivierte primäre porcine Hepatozyten. Die großen Kästchen (schwarz) stellen Vergrößerungen aus einem definierten Bereich der Zellkultur (kleine Kästchen) dar. Es wurden repräsentative Bilder aus 3 unabhängigen Zellpräparationen ausgewählt.

#### 4.7.4 Harnstoffsynthese in hepatozytär differenzierten MSC

Die Detoxifikation von Ammoniak im Harnstoffzyklus ist eine exklusive Funktion der Hepatozyten und benötigt ein ausgeklügeltes enzymatisches Netzwerk um den Metabolitfluss zwischen Zytosol und Mitochondrium zu gewährleisten. Mit fortschreitender hepato gener Differenzierung steigt die Harnstoffsyntheserate signifikant in hepatozytär differenzierten MSC subkutanen Ursprungs von  $0,18 \pm 0,17$  nmol/10.000 Zellen x 24 h am Tag 0 auf  $1,32 \pm 0,08$  nmol/10.000 Zellen x 24 h an Tag 21 der Differenzierung ( $p \leq 0,01$ ; t-Test) (Abb. 31). Die Harnstoffsyntheserate unterscheidet sich nicht signifikant von der in 9 Tage kultivierten primären porcinen Hepatozyten ( $1,70 \pm 0,14$  nmol/10.000 Zellen x 24 h).

Auch nach hepato gener Differenzierung von pBM-MSC stieg die Harnstoffsyntheserate von  $0,55 \pm 0,15$  nmol/10.000 Zellen x 24 h an Tag 0 auf  $1,38 \pm 0,13$  nmol/10.000 Zellen x 24 h nach 21 Tagen ( $p \leq 0,01$ ; t-Test) (Abb. 31).

Zu jedem Kulturzeitpunkt war die Harnstoffsyntheserate von hepatozytär differenzierten MSC aus dem subkutanen und viszeralen Fettgewebe vergleichbar mit der Harnstoffsyntheserate in MSC aus Knochenmark. Lediglich am 21. Tag der hepato genen Differenzierung von pATvis-MSC war die Harnstoffsyntheserate signifikant geringer als die in pATsub-MSC und in pBM-MSC (Abb. 31).

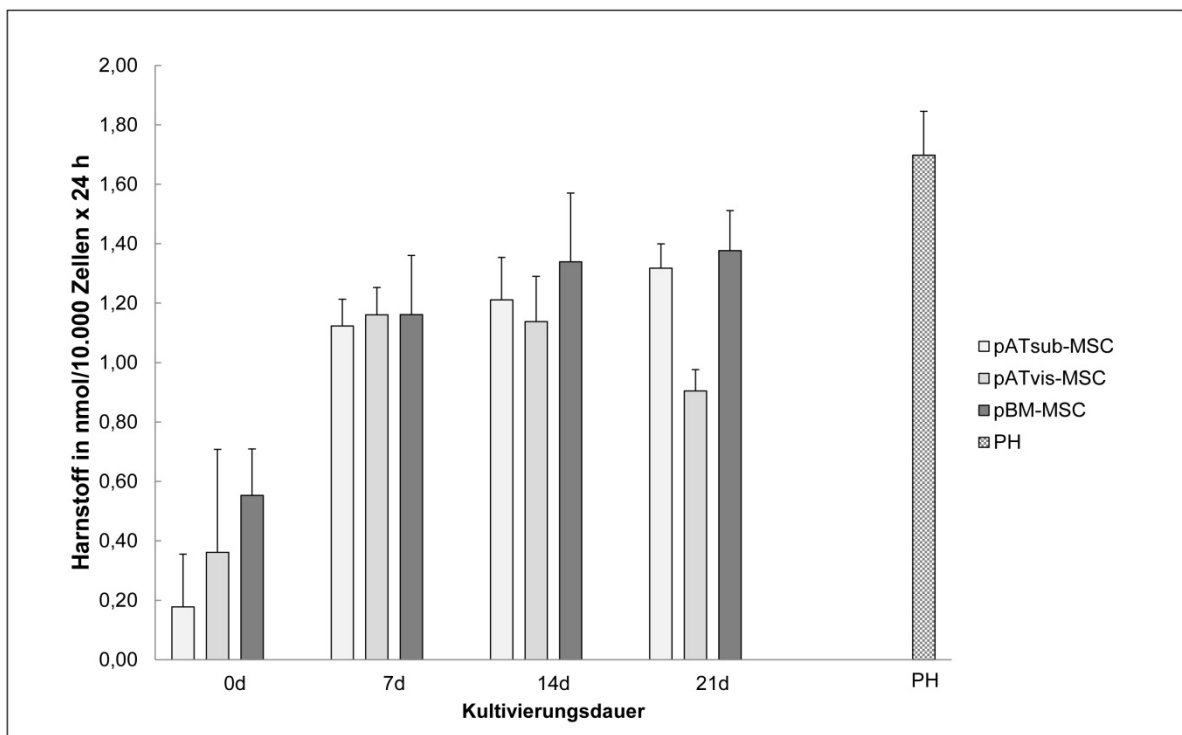


Abb. 31 Zeitabhängiger Anstieg der Harnstoffsyntheserate in hepato gen differenzierten porcinen MSC

Dargestellt ist die Harnstoffsyntheserate in nmol/10.000Zellen x 24 h in hepato gen differenzierten porcinen MSC aus dem subkutanen Fettgewebe (pATsub-MSC, hellgrau), dem viszeralen Fettgewebe (pATvis-MSC, grau) und dem Knochenmark (pBM-MSC, dunkelgrau) zu den 0 d, 7 d, 14 d und 21 d der Differenzierung. Zum Vergleich ist die Harnstoffsyntheserate von 9 Tage kultivierten, primären porcinen Hepatozyten (PH) gezeigt (gepunktet). Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Zellpräparationen bestimmt.



#### 4.7.5 Cytochrom P450 Aktivität

Die Detoxifikation von Xenobiotika durch das Cytochrom P450-System ist eine wesentliche funktionelle Eigenschaft von Hepatozyten. Im Nachfolgenden wurden die CYP1A1- und CYP2B1-Aktivitäten in den porcinen MSC zu verschiedenen Zeitpunkten der hepatogenen Differenzierung bestimmt und mit den Aktivitäten in primären kultivierten porcinen Hepatozyten verglichen.

##### **EROD (CYP1A1-Aktivität)**

Mit zunehmender Kulturdauer unter hepatogenen Differenzierungsbedingungen stieg die CYP1A1-Aktivität in MSC sowohl aus Fettgewebe als auch aus dem Knochenmark signifikant an. Sie stieg in pBM-MSC von  $2,88 \pm 0,69$  pmol/10.000 Zellen x h an Tag 0 auf  $21,17 \pm 1,32$  pmol/10.000 Zellen x h am 21. Tag der Differenzierung ( $p \leq 0,001$ ; T-test). Dies entspricht in etwa der CYP1A1-Aktivität in 3 Tage kultivierten, primären porcinen Hepatozyten ( $29,08 \pm 5,16$  pmol/10.000 Zellen x h). Die CYP1A1 Aktivität hepatogen differenzierter MSC aus dem Fettgewebe war nur halb so hoch wie die Aktivität in MSC aus Knochenmark. So stieg die Enzymaktivität der pATsub-MSC von  $0,15 \pm 0,84$  pmol/10.000 Zellen x h an Tag 0 auf  $9,91 \pm 0,53$  pmol/10.000 Zellen x h am 21. Differenzierungstag. Die CYP1A1-Aktivität der pATvis-MSC war noch etwas geringer und lag bei  $7,19 \pm 0,81$  pmol/10.000 Zellen x h am 21. Differenzierungstag (Abb. 32).

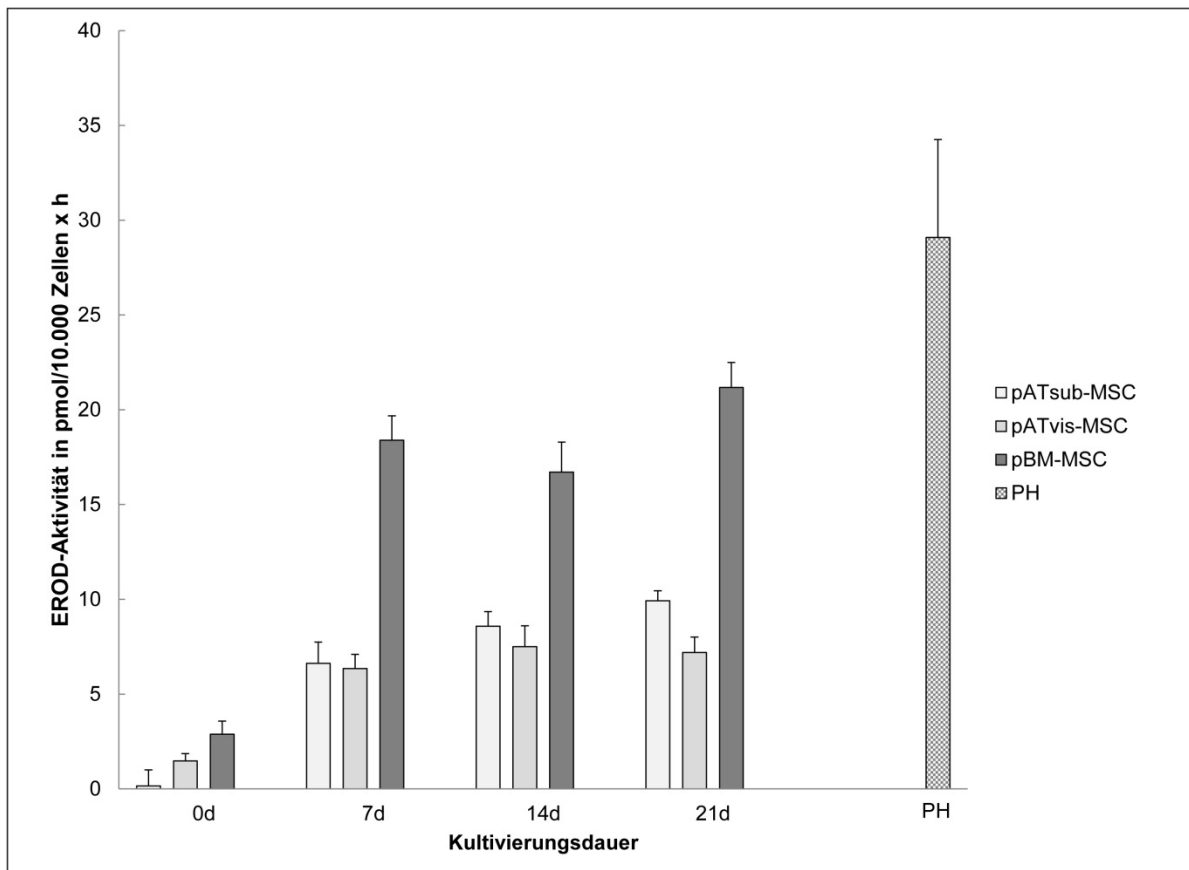


Abb. 32 Zeitabhängiger Anstieg der CYP1A1-Aktivität in hepatogen differenzierten, porcinen MSC

Dargestellt ist die CYP1A1-Aktivität (EROD) in pmol/10.000 Zellen x h in hepatogen differenzierten, porcinen MSC aus dem subkutanen Fettgewebe (pATsub-MSC, hellgrau), dem viszeralen Fettgewebe (pATvis-MSC, grau) und dem Knochenmark (pBM-MSC, dunkelgrau) zu den Zeitpunkten 0 d, 7 d, 14 d und 21 d der Differenzierung. Zum Vergleich ist die CYP1A1-Aktivität von 3 Tage kultivierten, primären porcinen Hepatozyten (PH) gezeigt (gepunktet). Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Zellpräparationen bestimmt.

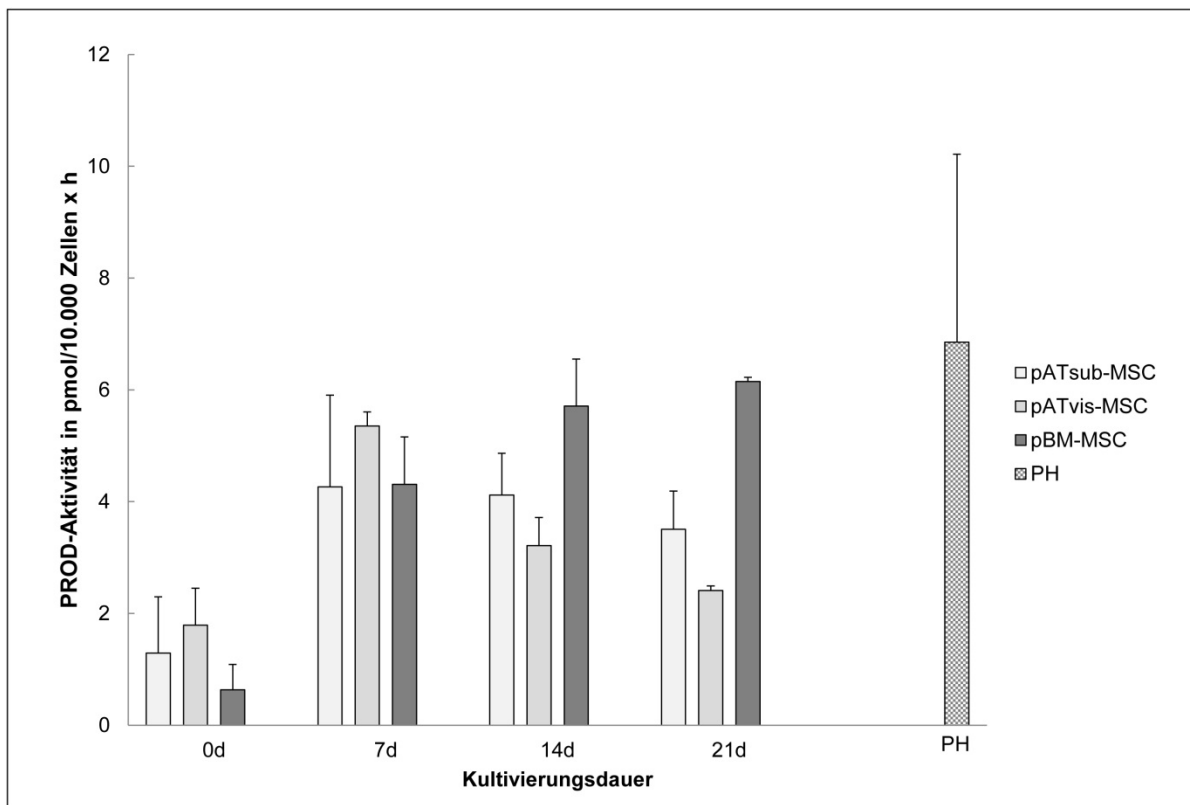
### PROD (CYP2B1-Aktivität)

Die CYP2B1-Aktivität stieg während der hepatozytären Differenzierung der pBM-MSC kontinuierlich an. So lag die Aktivität in undifferenzierten pBM-MSC bei  $0,63 \pm 0,45$  pmol/10.000 Zellen x h und nach 21 Tagen der hepatogenen Differenzierung bei  $6,14 \pm 0,07$  pmol/10.000 Zellen x h. Dies war vergleichbar mit der CYP2B1-Aktivität in 3 Tage kultivierten, primären porcinen Hepatozyten ( $6,85 \pm 3,36$  pmol/10.000 Zellen x h).

Die CYP2B1-Aktivität in pATsub-MSC war am siebten Differenzierungstag 3-mal höher ( $4,26 \pm 1,64$  pmol/10.000 Zellen x h) als im undifferenzierten Zustand ( $1,28 \pm 1,00$  pmol/10.000 Zellen x h). Die Aktivität blieb ebenfalls am 21. Differenzierungstag erhöht und betrug  $3,50 \pm 0,68$  pmol/10.000 Zellen x h. Die höchste CYP2B1-Aktivität in pATvis-MSC konnte am Tag 7 der hepatogenen Differenzierung gemessen werden und betrug hier  $5,35 \pm 0,25$  pmol/10.000 Zellen x h. Am Tag 21 der hepatogenen Differenzierung lag die

Aktivität nur noch bei  $2,40 \pm 0,08$  pmol/10.000 Zellen x h. Zu diesem Zeitpunkt war die CYP2B1-Aktivität in hepatogen differenzierten MSC aus dem Fettgewebe nur halb so hoch wie die Aktivität der MSC aus Knochenmark (Abb. 33).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass MSC des Schweins sowohl aus dem Fettgewebe als auch aus dem Knochenmark nach hepatogener Differenzierung wichtige funktionelle hepatozytäre Eigenschaften aufwiesen, die qualitativ und quantitativ mit denen kultivierter, primärer porciner Hepatozyten vergleichbar waren.



**Abb. 33 Zeitabhängiger Anstieg der CYP2B1-Aktivität in hepatogen differenzierten, porcinen MSC**

Dargestellt ist die CYP2B1-Aktivität (PROD) in pmol/10.000Zellen x h in hepatogen differenzierten, porcinen MSC aus dem subkutanen Fettgewebe (pATsub-MSC, hellgrau), dem viszeralen Fettgewebe (pATvis-MSC, grau) und dem Knochenmark (pBM-MSC, dunkelgrau) zu den Zeitpunkten 0 d, 7 d, 14 d und 21 der Differenzierung. Zum Vergleich ist die CYP2B1-Aktivität in 3 Tage kultivierten, primären porcinen Hepatozyten (PH) gezeigt (gepunktet). Die Mittelwerte wurden aus 3 unabhängigen Zellpräparationen bestimmt.

## 5 Diskussion

### 5.1 Verbesserung der Effizienz der Hepatozytentransplantation durch pharmakologische Maßnahmen

#### 5.1.1 Selektive Immunsuppression bei Leberzelltransplantation

Die Transplantation von Organen erfordert eine lebenslange Immunsuppression welche mit massiven Nebenwirkungen wie zum Beispiel Nephrotoxizität assoziiert ist. Die Hepatozytentransplantation als Alternative zur Lebertransplantation ist nicht nur minimal invasiv sondern auch mit geringeren immunologischen Komplikationen verbunden. 1967 wurde das immunologische Phänomen der portalvenösen Akzeptanz [37] beschrieben. So sollte die Möglichkeit evaluiert werden, ob die allogenen Spenderhepatozyten durch die Applikation über die Portalvene immunologisch besser akzeptiert werden und keine beziehungsweise eine geringe immunsuppressive Behandlung im Anschluss an die Transplantation erforderlich ist.

Bis zum Zeitpunkt 5 Tage nach allogener Hepatozytentransplantation konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Integration zwischen syngenen und allogenen Hepatozyten beobachtet werden. 3 Wochen nach Transplantation syngener Hepatozyten betrug die Repopularisierungsrate zirka 1 %, nach Transplantation allogener Hepatozyten waren jedoch keine Spenderzellen mehr nachweisbar. Dies weist daraufhin, dass eine Abstoßungsreaktion von portalvenös applizierten Hepatozyten im Zeitraum von 5 Tagen bis 3 Wochen stattfand, so dass die in der Literatur beschriebene Tolerogenität portalvenös applizierter Zellen [37] in dieser Arbeit für allogene Hepatozyten nicht bestätigt werden konnte. Es stellte sich nunmehr die Frage, welches die geeignete immunsuppressive Therapie nach allogener Hepatozytentransplantation ist. Aus der Literatur war bekannt, dass offensichtlich leberresidente Makrophagen (Kupfferzellen) an der Eliminierung syngener transplanterter Hepatozyten beteiligt sind. Die Behandlung mit Gadoliniumchlorid schaltet die in den Sinusoiden lokalisierten Kupfferzellen aus, so dass weniger transplantierte Hepatozyten aus den Sinusoiden eliminiert wurden und dadurch eine 2-fach höhere Transplantationseffizienz erzielt werden konnte [74]. Im hier untersuchten Modell der allogenen Hepatozytentransplantation konnte durch die Depletion der Kupfferzellen mit Gadoliniumchlorid die Abstoßungsreaktion weder verlangsamt noch komplett unterdrückt werden. Daher kann, anders als in der Literatur bisher beschrieben, eine wesentliche Beteiligung der Kupfferzellen, ausgeschlossen werden. Die Depletion von

Makrophagen und somit auch der Kupfferzellen in der Leber ist nur durch die intravenöse Applikation des Gadoliniumchlorid zu erreichen [75]. Um auszuschließen, dass die unter Gadoliniumchloridbehandlung weiterhin beobachtete Abstoßung der allogenen Hepatozyten auf eine unzureichende Wirkung des Gadoliniumchlorid zurückzuführen war, wurden die Kupfferzellen in der Leber durch die Objektträger-basierte Zytometrie analysiert. Es konnte nur noch ein geringer Anteil (1 %) an Kupfferzellen nachgewiesen werden, so dass die Schlussfolgerung, dass diese nicht wesentlich an der Abstoßung beteiligt waren, untermauert wurde (Abb. 7).

Der Zeitraum der Abstoßung allogenen transplantierten Hepatozyten zwischen 5 Tagen und 3 Wochen, lässt darauf schließen, dass T-Zellen daran beteiligt gewesen sein könnten. Und tatsächlich konnte die Abstoßungsreaktion durch Cyclosporin A, das die Proliferation der T-Zellen selektiv inhibiert, verhindert werden. Ein weiteres in der Klinik häufig verwendetes Immunsuppressivum, das Mycophenolat, konnte zwar die Abstoßung der transplantierten Zellen verhindern, verhinderte aber ebenfalls die Ausbreitung der Zellcluster. Mycophenolat wirkt als selektiver Inhibitor der Iosin-Monophosphat-Dehydrogenase und blockiert dadurch die Purinsynthese in proliferierenden Zellen. Durch diese nicht selektive Wirkung auf in der S-Phase des Zellzyklus befindliche Zellen wird zwar die Proliferation von T- und B-Lymphozyten gehemmt. Allerdings erstreckt sich die zytostatische Wirkung des Mycophenolat wahrscheinlich in gleicher Weise auch auf die Proliferation der transplantierten Hepatozyten. Dies macht deutlich, dass die klinische Richtlinie zum Einsatz von Immunsuppressiva nach Lebertransplantation [29] nicht ohne Weiteres auf die Hepatozytentransplantation übertragen werden kann. Vielmehr ist der Einsatz von Mycophenolat nach Zelltransplantation auf Grund der zytostatischen Wirkung und der damit verbundenen Hemmung der Proliferation der Spenderhepatozyten gänzlich ungeeignet.

### **5.1.2 Cyclosporin A verbessert die Repopularisierung des Empfängerparenchyms durch die Spenderhepatozyten**

Die Effizienz der Hepatozytentransplantation wurde von Laconi *et. al* im syngenem Modell für männliche Empfängertiere 2 Wochen nach der Zelltransplantation zwischen 10-15% beschrieben [30]. Im hier untersuchten Modell betrug diese jedoch nur etwa 1%. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich durch das unterschiedliche Ausmaß der Leberteilresektion bedingt, die ja einen Regenerationsstimulus darstellt. Während bei Laconi eine 2/3 Hepatektomie durchgeführt wurde, wurde in dieser Arbeit eine 1/3 Hepatektomie

durchgeführt, die gegenüber der 2/3 Hepatektomie sicher einen schwächeren Proliferationsreiz setzt. Die Abänderung gegenüber dem von Laconi beschriebenen Transplantationsmodell wurde vorgenommen, um die klinische Relevanz besser zu simulieren, da hier eher weniger umfangreiche Resektionen üblich sind. Technisch birgt eine Hepatektomie mit geringerem Ausmaß auch immer ein geringeres chirurgisches Risiko und verbessert so Reproduzierbarkeit. Biologisch ist eine Repopularisierung von 1 % der Lebermasse durchaus ausreichend, um den funktionellen Gewebeersatz zu gewährleisten und ausreichend metabolische Kapazität zur Verfügung zu stellen [80-81]. Die hier erhobenen Daten stehen im Einklang mit veröffentlichten Ergebnissen von König *et.al.*, die 3 Wochen nach der Transplantation im syngenem Rattenmodell nach 1/3 Hepatektomie eine Repopularisierungsrate von zirka 1 % zeigten [82].

Im allogenen Transplantationsmodell zeigte sich nach der Behandlung mit Cyclosporin A, dass im Vergleich zum syngenem Modell ohne Behandlung eine größere Anzahl an Clustern transplantierte Zellen im Empfängerparenchym auftraten (Abb. 9). Dies deutete darauf hin, dass das Cyclosporin A unabhängig von seiner immunsuppressiven Wirkung die Integrationsrate transplantierte Hepatozyten verbesserte. Diese Hypothese wurde dadurch bestätigt, dass nach Einsatz des Cyclosporins im syngenem Transplantationsmodell ebenfalls eine 10-fach erhöhte Integrationsrate der Spenderzellen beobachtet werden konnte. Da im syngenem Transplantationsmodell nicht mit Abstoßungsreaktionen zu rechnen ist, muss die Wirkung des Cyclosporin A auf andere Mechanismen zurück zu führen sein. So ist zum Beispiel denkbar, dass die lipophile Struktur des Cyclosporins die Durchlässigkeit der Endothelzellbarriere beeinflusst und so den Übertritt der transplantierten Hepatozyten ins Leberparenchym erleichtert. Über die chemische Beeinflussung der Durchlässigkeit der Endothelzellbarriere im Zusammenhang mit Leberzelltransplantation wurde auch von Malhi *et. al* berichtet. Das Zytostatikum Cyclophosphamid führte zur Zerstörung der Endothelien und dadurch zu einer verbesserten Hepatozytenintegration [76]. Die Beeinträchtigung des Endotheliums nach Cyclosporin A-Behandlung der Empfänger konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der immunhistochemischen Färbung mit dem Endothelzellmarker OX-46 gezeigt werden, die eine deutliche Disintegration bzw. Rückbildung der Endothelien belegte (Abb. 11). Dass Cyclosporin A neben seiner immunologischen Wirkung noch andere pharmakologische Wirkungen besitzt, ist bereits bekannt. So befindet sich derzeit ein nicht immunologisch wirksames Struktur analogon (Valspodar, PSC833, Novartis) des Cyclosporins A in der klinischen Testung, das als Modulator des MDR- (*Multi Drog resistance*) Transporters

bei Karzinomzellen beschrieben wird [83] Daher könnte sich Cyclosporin A im klinischen Alltag besonders gut eignen, die Abstoßungsreaktionen nach allogener Hepatozytentransplantation zu verhindern, da es gleichzeitig aufgrund seiner anderen pharmakologischen Wirkungen die Transplantationseffizienz signifikant erhöht. Grundsätzlich wäre es denkbar, die Empfänger von Hepatozytentransplantaten mit geeigneten, auch nicht immunologisch wirksamen Pharmaka, die die Durchlässigkeit der Endothelzellbarriere verbessern vorzubehandeln, um die Spenderzellintegrationsrate zu verbessern.

## **5.2 Stammzellbasierte Hepatozytentransplantation bei akuter und chronischer Leberschädigung**

Angesichts anhaltender Organknappheit gewinnt die Entwicklung von Alternativen zur Lebertransplantation bei akuten und chronischen Lebererkrankungen im Endstadium zunehmend an Bedeutung. „Die Zahl der Neuanmeldungen auf der Warteliste für eine Lebertransplantation hat in den vergangenen Jahren im Trend zugenommen, im Jahr 2011 sank sie auf 1.792. Die Zahl der Transplantationen sank ebenfalls auf 1.199. Die Kluft zwischen der Zahl der angemeldeten Patientinnen und Patienten und der Zahl der durchgeführten Transplantationen bleibt nach wie vor bestehen“ (Zitat Dt. Stiftung Organtransplantation). D.h. ein Drittel der Patientinnen und Patienten, die eine Lebertransplantation benötigen, stehen auf der Warteliste. 30-40% versterben ohne Transplantation. Da nicht genügend Organe für die Transplantation zur Verfügung stehen, stehen ebenfalls keine Organe zur Isolierung von Hepatozyten für die Hepatozytentransplantation bereit, die sich ja im Tiermodell als machbare Alternative gezeigt hat. Mesenchymale Stammzellen (MSC) gelten heute als aussichtsreiche Option zur Etablierung eines zelltherapeutischen Ansatzes bei Lebererkrankungen im Endstadium. Sie sind leicht verfügbar, können aus dem Knochenmark, Fett- oder auch Knorpelgewebe isoliert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass aus mesenchymalen Stammzellen in vitro Hepatozyten generiert werden können.

### **5.2.1 Therapeutisch nutzbare Eigenschaften der mesenchymalen Stammzellen**

Wie bereits in der Literatur beschrieben, können mesenchymale Stammzellen aus humanen [57-58,66] Geweben und auch aus Geweben der Ratte [55] isoliert werden. Sie exprimieren mesenchymale Oberflächenmarker aber keine hämatopoietischen und weisen multiple Differenzierungsfähigkeit auf. Um die Identität der in dieser Arbeit verwendeten MSC aus Fettgewebe zu belegen, konnte gezeigt werden, dass die stammzelltypischen

Oberflächenmoleküle CD44 und CD29, nicht aber der hämatopoietische Marker CD45 exprimiert wurden (Abb. 12). Weitere Marker konnten aufgrund fehlender Rattenantigenspezifischer Antikörper nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnte das *multilineage* Differenzierungspotential [40] der aus Fettgewebe isolierten MSC anhand ihrer Differenzierung in osteozytäre, adipozytäre und hepatozytäre Zellen gezeigt werden (Abb. 13 und 14). Somit konnten die nach dem hier angewandten Verfahren isolierten Zellen aus dem Fettgewebe als mesenchymale Stammzellen gelten.

Mesenchymale Stammzellen besitzen die Fähigkeit, in entzündete bzw. geschädigte Gewebe zu migrieren wie bereits aus der Literatur bekannt ist [78]. So konnte gezeigt werden, dass nach Verletzung des Rückenmarkes MSC, welche in die lumbale Cerebrospinalflüssigkeit injiziert wurden, zum Ort der Rückenmarksläsion migrierten und sich dort integrierten [84]. Auch wurde im Rattenmodell des akuten Nierenversagens, welches mit tubulären Nekrosen einhergeht, nachgewiesen, dass systemisch applizierte MSC in die geschädigten Nierenregionen einwanderten [85]. Dieselbe Gruppe belegte ebenfalls, dass für die Migration und Integration systemisch applizierter MSC das Oberflächenmolekül CD44 verantwortlich ist [85]. CD44 scheint also für die Migrationsfähigkeit der MSC eine wichtige Rolle zu spielen. Da dieses ebenfalls auf den in dieser Arbeit verwendeten mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird., liegt es also nahe zu vermuten, dass die transplantierten Zellen gerade deshalb die Fähigkeit besitzen, nach systemischer Applikation in geschädigte Leberbereiche zu migrieren. Und tatsächlich wanderten in den beiden untersuchten Schädigungsmodellen der akut durch Paracetamol (Abb. 17) und der chronisch durch CCl<sub>4</sub>-Inhalation (Abb. 24) geschädigten Leber die über die Schwanzvene systemisch applizierten MSC in das geschädigte Leberparenchym ein und integrierten sich dort im Gewebe. Während zu frühen Zeitpunkten nach der Transplantation (5-7 Tage) nur einzelne ins Gewebe integrierte Zellen zu finden waren, konnte im Modell der durch CCl<sub>4</sub> induzierten Leberzirrhose gezeigt werden, dass sich die transplantierten Zellen 3 und 10 Wochen nach der Transplantation vermehrt hatten und im Gewebe verblieben.

Histologische und klinische Parameter sowie die Proliferationsfähigkeit des Empfängerlebergewebes waren aber auch schon zu den frühen Zeitpunkten verbessert (Abb. 21 – 27). Da man davon ausgehen kann, dass bis zu 5 Tagen nach Transplantation noch keine vollständige Integration der Zellen ins Wirtsparenchym und somit kein funktioneller Gewebeersatz erfolgt sein kann, kann vermutet werden, dass parakrine



Faktoren die Regeneration des Lebergewebes positiv beeinflussten und somit die gemessenen Parameter verbesserten.

Prominente Faktoren, welche von Stammzellen sezerniert werden, sind unter anderem der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *stem cell factor* (SCF), *hepatocyte growth factor* (HGF), *insulin-like growth factor-1* und *-2* (IGF-1, -2), *stromal-derived factor-1* (SDF-1), allesamt Faktoren, die die Regeneration und Immunmodulation unterstützen [49]. Neben löslichen Faktoren, die eine unterstützende Rolle bei der Regeneration von geschädigten Organen durch Stammzellen spielen [86], kommunizieren MSC mit Zielzellen im Empfängerparenchym auch über den Austausch von Mikrovesikeln und miRNA, die von den MSC abgegeben werden [87]. Die funktionelle Verbesserung des Myocardgewebes durch die systemische Gabe von humanen mesenchymalen Stammzellen wurde bereits in einem Herzinfarktmodell in der Maus durch Iso *et. al* gezeigt [88]. Hier wurde eine deutliche Verbesserung der Myocardfunktion festgestellt, ohne dass eine hohe Integration der MSC im Gewebe nachweisbar war. Für die funktionelle Verbesserung ausschlaggebend waren von den MSC sezernierte, parakrin wirkende Faktoren wie Adrenomedullin, VEGF, HGF und IL-6 [88].

### **5.2.2 Pro-regenerative Wirkung mesenchymaler Stammzellen bei akuter Leberschädigung**

In der Literatur ist beschrieben, dass sich Spenderzellen nach direkter Injektion in das Gefäßsystem der Leber in den periportalen Regionen des Leberparenchyms ansiedeln [79]. In der vorliegenden Untersuchung konnte dies in Kontrollmäusen ohne akute Leberschädigung bestätigt werden. Jedoch nach Intoxikation mit Paracetamol waren die Spenderzellen in perivenösen Bereichen des Parenchyms nachweisbar (Abb. 21). Dieser überraschende Befund könnte zwei Erklärungen haben: 1. Die durch Paracetamol induzierte, perivenös lokalisierte hepatische Nekrose wird von einer zentrilobulären mikrovaskulären Stauung und Infiltration von Blutbestandteilen in den Dissé-Raum begleitet, die durch die Vergrößerung der Fenestrierung im Endothelium verursacht wird [89]. Dadurch wird der Einstrom der transplantierten Zellen in die perivenösen Parenchymbereiche mechanisch begünstigt. 2. Es ist aber auch denkbar, dass die Zellen aktiv in die geschädigten Bereiche migrieren und dort das Fortschreiten der akuten Leberschädigung über die oben beschriebenen parakrinen Effekte vermindern. Dafür spricht auch der zunächst kontrovers erscheinende zeitliche Verlauf der Apoptoserate. Kurz nach der Zellapplikation war die Apoptoserate im Vergleich zu Tieren ohne Zellapplikation geringer. Die Apoptoserate stieg jedoch an Tag 2 wieder an und fiel an Tag

3 nach Zelltransplantation wieder ab (Abb 22 C, D). Dies ist vermutlich auf die Reorganisation des Leberparenchyms zurückzuführen. Der überwiegende Teil der transplantierten Zellen, welche in das geschädigte Parenchym eingewandert sind und dort zunächst über parakrine Effekte den Progress der Leberschädigung hemmten, geht nach einer gewissen Zeit zu Grunde und schafft somit Platz für Hepatozyten, die durch die Proliferation des Empfängerparenchyms gebildet werden. Diese Vermutung wird auch durch den zeitlichen Verlauf der zur Apoptose komplementär verlaufenden Proliferationsrate unterstützt (Abb. 22 A, B). Somit konnte sowohl im Ratten- als auch im Mausmodell der akuten Leberschädigung durch Paracetamol die die Leberregeneration unterstützende Wirkung der MSC gezeigt werden. Diese beruhte auf 3 wesentlichen Mechanismen: der pro-proliferativen und anti-apoptotischen Wirkung auf das Wirtsparenchym und auf der Migration der MSC in die akut geschädigten Leberbereiche, in denen parakrine Effekte die Schadensprogression verhinderten. Diese letztgenannte Wirkung der MSC ist wahrscheinlich auf deren anti-inflammatorische Eigenschaften zurückzuführen, die zur Hemmung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, der Stimulation der Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen sowie zur Hemmung der Infiltration von Entzündungszellen führt, eine in der Literatur beschriebene prominente biologische Eigenschaft von MSC [90].

In der Literatur sind einige Rattenmodelle der akuten Leberschädigung durch Paracetamol beschrieben. Diese verwenden unterschiedliche Intoxikationsregime von 1-2 g/kg [91-93] bis 100-500 mg/kg [94-95]. Da Ratten gegenüber Paracetamolintoxikation aber sehr resistent sind, wird in der Literatur auch diskutiert, ob ein Mausmodell, welches schon bei geringerer Paracetamoldosis einen akuten Leberschaden entwickelt, der klinischen Situation beim Menschen eher entspricht und daher dem Rattenmodell experimentell vorzuziehen ist [96]. Mit dem in dieser Arbeit speziell entwickelten Intoxikationsregime bei der Ratte konnte ein reproduzierbarer, stabiler, akuter Leberschaden erzeugt werden. Dennoch wurden die Analysen zu den pro-proliferativen und anti-apoptotischen Eigenschaften der MSC ebenfalls am xenogenen Mausmodell mit humanen MSC durchgeführt. Wie im syngenem Rattenmodell konnten auch hier die protektiven Eigenschaften der MSC auf das geschädigte Leberparenchym nachgewiesen werden. Einen direkten Einfluss der transplantierten Zellen auf die Serumtransaminasen AST und ALT als Maß der Leberschädigung konnte, anders als Salomone *et.al* berichten, nicht festgestellt werden [97].

### 5.2.3 Anti-fibrotische Wirkung mesenchymaler Stammzellen bei chronischer Leberschädigung

Die Langzeitbehandlung von Ratten mit  $\text{CCl}_4$  führt zur chronischen Leberschädigung in Form der Leberzirrhose mit einhergehender Verschlechterung der Leberfunktion. Diese spiegelt sich in einer Verschlechterung der Albuminsynthese und der Blutgerinnung sowie einem Anstieg des Bilirubins im Serum wieder. Anders als in der Literatur beschrieben wurden durch die MSC-Applikation keine signifikante Verbesserung der relevanten Blutparameter, erreicht. Allerdings konnten die für mesenchymale Stammzellen in der Literatur beschriebene anti-fibrotische Wirkung bestätigt werden [98-99]. Die vermehrte Bildung von Kollagen führt in der Leberzirrhose zum Gewebeumbau mit Bildung von fibrotischen Septen, die in der Histologie deutlich zu erkennen sind (Abb. 24). 3 Wochen nach MSC-Applikation waren die fibrotischen Leberareale signifikant kleiner als ohne MSC-Applikation. Eine Konsequenz des Gewebeumbaus bei einer Leberzirrhose ist die Minderdurchblutung der Leber aufgrund des erhöhten Gefäßwiderstandes in der Leber (*portale Hypertension*). Die dadurch gebildeten Umgehungskreisläufe haben wiederum eine Vergrößerung der Milz zur Folge (*Splenomegalie*). Im hier benutzten Zirrhosemodell konnte drei Wochen nach MSC-Applikation nicht nur eine Verbesserung der Fibrose nachgewiesen werden, auch die Milzgewichte waren signifikant kleiner. Dies lässt vermuten, dass sich die MSC positiv auf den portalen Blutdruck auswirkten. Eine vaskuläre Wirkung von MSC konnte auch durch Oliveira-Sales *et. al* gezeigt werden [100]. Die Applikation von mesenchymalen Stammzellen senkte den renovaskulären Druck und verbesserte somit die Nierenfunktion und Gewebearchitektur im Modell der partiell okkludierten Nierenarterie, ob die MSC in der Leber den Portaldruck auf ähnliche Weise beeinflussten, kann nur durch eine direkte Portaldruckmessung nach Stammzellaplikation evaluiert werden. Die Verringerung der Milzgewichte kann hier nur als indirektes Indiz gewertet werden. Die Volumenzunahme der Milz geht auch mit einer Überfunktion der Milz einher, so dass zu viele Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten gespeichert und abgebaut werden. Das führt zu einem Mangel an Thrombozyten im Blut, der auch als Thrombozytopenie bezeichnet wird [101]. Während des fibrotischen Umbaus des Lebergewebes werden von aktivierten hepatischen Sternzellen extrazelluläre Matrixproteine synthetisiert und abgelagert, wodurch die fibrotischen Areale, die überwiegend aus Kollagen I-Fasern bestehen, entstehen. Thrombozyten können hepatische Sternzellen HGF-vermittelt inaktivieren [102]. Denkbar ist also auch, dass die mesenchymalen Sternzellen nicht direkt den portalvenösen Druck, sondern die Thrombozyten zur HGF-Synthese stimulieren, beziehungsweise selbst HGF sezernieren,

das die hepatischen Sternzellen und damit die für die Fibrose typische vermehrte Kollagensynthese hemmt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass systemisch oder direkt hepatisch applizierte MSC im durch Paracetamol akut geschädigten Lebergewebe anti-inflammatorisch und – apoptotisch sowie pro-proliferativ wirken. Auf das chronisch fibrotisch veränderte Lebergewebe wirkten die MSC anti-fibrotisch und verbesserten dadurch die für die Leberzirrhose kritische portale Hypertension. In beiden Fällen, also sowohl nach akuter als auch nach chronischer Leberschädigung, bewirkten die MSC eine Unterstützung der Leberregeneration.

### **5.3 Hepatozytäre Differenzierung von porcinen mesenchymalen Stammzellen**

Die Überführung der Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung an Labortieren wie Maus und Ratte in die klinische Anwendung setzt die präklinische Forschung an Großtiermodellen wie dem Schwein voraus. Das Vorkommen von mesenchymalen Stammzellen in den verschiedensten Gewebetypen und Spezies wie Ratte [65,103-104], Maus [105-107] und Mensch [66,108] ist hinreichend beschrieben. Aufgrund der anatomischen und physiologischen Vergleichbarkeit des Schweins mit dem Menschen, läge es nahe zu vermuten, dass auch Erkenntnisse zu MSC aus Schweinen vorliegen. Diese sind zur Überführung der Zellen in die klinische Anwendung, insbesondere zur Überprüfung der Sicherheit und Wirksamkeit sowie den möglichen Applikationswegen nötig. Deshalb ist es verwunderlich, dass porcine mesenchymale Stammzellen in der Literatur erst wenig beschrieben sind [109-111]. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, MSC aus Geweben des Schweins zu isolieren und hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit für spätere präklinische Studien am Schwein charakterisieren.

Definitionsgemäß sind Minimalkriterien, die mesenchymale Stammzellen erfüllen müssen, die Fähigkeit, auf Plastik-Kulturunterlagen zu wachsen, die Fähigkeit zur Differenzierung in mindestens 2 andere Zelltypen sowie die Expression mesenchymaler Oberflächenmoleküle (z.B. CD44, CD29 und CD105) und das Fehlen von hämatopoetischen Oberflächenmolekülen (z.B. CD34, CD45). In der hier vorgelegten Arbeit zur Charakterisierung von porcinen MSC konnte gezeigt werden, dass sowohl MSC aus Fettgewebe verschiedenen Ursprungs (viszeral, subkutan) als auch aus dem Knochenmark diese Minimalkriterien erfüllen. Dies ist in Übereinstimmung mit Daten von porcinen Knochenmarkszellen wie durch Groth *et.al* [112] gezeigt wurden.

Bei Lebererkrankungen im Endstadium oder klinischen Situationen, welche mit einem massiven Verlust an funktionellem Leberparenchym einhergehen, stellen hepatozytär differenzierte mesenchymale Stammzellen zur Substitution der metabolischen Kapazität der Leber eine vielversprechende Therapieoption dar. Deshalb ist es naheliegend, die Fähigkeit mesenchymaler Stammzellen zur hepato-genen Differenzierung *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren. In verschiedenen Nagermodellen (Maus, Ratte) sowohl akuter als auch chronischer Lebererkrankungen konnte gezeigt werden, dass mesenchymale Stammzellen die Leberschädigung verbesserten, [113-116]. Es war nicht überraschend, dass im Vergleich zu undifferenzierten MSC die Integration von hepatozytär differenzierten Spenderstammzellen ins Empfängerlebergewebe effizienter war und damit ein höherer therapeutischer Effekt erzielt werden konnte [65]. Deshalb wurde das hepato-gene Differenzierungspotential von porcinen mesenchymalen Stammzellen aus unterschiedlichen Ursprungsgeweben (Knochenmark, viszerales und subkutanes Fettgewebe) hinsichtlich hepatozytenspezifischer metabolischer Eigenschaften bewertet. Wichtige funktionelle Eigenschaften von Hepatozyten sind die Glykogen- und Harnstoffsynthese sowie die Detoxifikation von Xenobiotica durch das Cytochrom P450-System [117]. Sowohl die MSC aus dem viszeralen und subkutanen Fettgewebe als auch aus dem Knochenmark wiesen nach hepato-gener Differenzierung all diese Funktionen auf. Die Glykogen- und Harnstoffsynthese sowie die CYP1A1- und CYP2B1-Aktivität bewegten sich in der gleichen Größenordnung wie die primärer porciner Hepatozyten nach einigen Tagen in Zellkultur. Es war bereits bekannt, dass in primären Hepatozyten nach einiger Zeit in Zellkultur die spezifischen Hepatozytenfunktionen vermindert sind [118]. Dies ist auch in primären Hepatozyten des Schweins so, welche nach 8 Tagen Kultivierungsdauer nur noch 10-20 % der für frisch isolierte Hepatozyten spezifischen metabolischen Aktivität aufweisen [119]. Dieser Verlust kann *in vitro* teilweise durch die Behandlung mit spezifischen Induktoren wieder rückgängig gemacht werden. So kann durch Zugabe von cAMP die Carbamoylphosphat-Synthetase transkriptionell induziert werden, so dass auch die Harnstoffsyntheserate wieder ansteigt. Ein weiteres Beispiel ist die Induktion der Aktivität der CYP1A Subtypen durch  $\beta$ -Naphthoflavon. Dies weist darauf hin, dass der Verlust der metabolischen Aktivität von primären Hepatozyten in der Kultur nicht auf eine De-Differenzierung zurückzuführen ist, sondern eher eine Konsequenz der fehlenden physiologischen Umgebung der Leber ist, die die für die Aufrechterhaltung der spezifischen hepatozytären Leistungen erforderlichen Signale, Metabolite und Mediatoren bereitstellt [120]. Deshalb ist es adäquat, die metabolischen Leistungen der drei Wochen

hepatozytär differenzierten MSC mit denen kultivierter anstelle von frisch isolierten primären Hepatozyten zu vergleichen. Allerdings zeigt es auch, dass unter Kulturbedingungen sicher keine vollständige Differenzierung der MSC in reife Hepatozyten zu erreichen ist. Wie für Hepatozyten selbst ist für hepatozytär differenzierte MSC die adäquate physiologische Umgebung der Leber zwingend notwendig, um den ausdifferenzierten hepatozytären Phänotyp zu erreichen. Diese belegen auch Ergebnisse aus Transplantationsexperimenten mit zuvor kultivierten primären Hepatozyten oder hepatozytär differenzierten MSC, die in der Kultur ihre hepatozytären Eigenschaften verloren bzw. nur teilweise erreichten, nach Transplantation in eine Empfängerleber aber durch ihre Integration in die physiologische Umgebung der Leber ihre volle metabolische Aktivität zurückgewinnen konnten [63,120].

Nach Abschluss der hepatogenen Differenzierung zeigte sich sowohl in den MSC aus dem Fettgewebe als auch bei den MSC aus dem Knochenmark eine signifikante Abnahme der Expression von CD105. CD105 (Endoglin) wird auf Endothelialzellen, Synzytiotrophoblasten, Makrophagen und Bindegewebszellen exprimiert [121]. Es scheint nicht nur bei der TGF- $\beta$ -vermittelten Signaltransduktion eine Rolle zu spielen, sondern es beeinflusst auch die chondrogene Differenzierung von MSC und vermittelt die Interaktion von hämatopoetischen Stammzellen mit ihrer Umgebung [121]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass sich MSC mit einer hohen Endoglinexpression im Vergleich zu MSC mit niedriger CD105-Expression besser in Hepatozyten differenzieren lassen [122]. Deshalb könnte man ableiten, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Expression von CD105 nach der hepatogenen Differenzierung ein Marker für eine erfolgreiche Differenzierung sein könnte.

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass MSC aus unterschiedlichen Geweben des Schweins isoliert und in hepatozytäre Zellen differenziert werden können. Dies ist eine wichtige Voraussetzung für ihre therapeutische Nutzung bei Lebererkrankungen im prä-klinischen Großtiermodell.

#### **5.4 Ausblick**

Es konnte sowohl experimentell als auch klinisch gezeigt werden, dass die Transplantation von Hepatozyten als mögliche Alternative zur Lebertransplantation machbar ist [123-124]. Auf Grund der Knappheit an verfügbaren Spenderorganen zur Isolierung von Hepatozyten ist es notwendig, alternativen Zellquellen zur Herstellung von Hepatozyten zu etablieren. Aufgrund ihres anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen sowie ihrer pro-regenerativen

Fähigkeiten rücken mesenchymale Stammzellen immer mehr in den klinischen Focus zur Therapie verschiedenster Lebererkrankungen [125-128]. Dieses klinische Interesse und die potentielle Verwendbarkeit von stammzellbasierten Zelltherapeutika verlangt präklinische Studien zur Evaluation der Sicherheit und des therapeutischen Nutzens sowie zur Etablierung sicherer Applikationswege. Aufgrund der guten anatomischen und physiologischen Vergleichbarkeit mit dem Menschen wurden in der jüngsten Vergangenheit im Schwein Modelle des durch Paracetamol induzierten akuten Leberversagens [129], und zur ausgedehnten Leberresektion als kurative Behandlung von Lebermetastasen [130], etabliert. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich porcine MSC sowohl aus Knochenmark als auch aus Fettgewebe leicht isolieren und hepatozytär differenzieren lassen. Damit kommen sie grundsätzlich als Therapeutikum in prä-klinischen Modellen verschiedener Lebererkrankungen in Frage. Es bleiben als Nachweis ihrer therapeutischen Tauglichkeit die bereits in Maus- und Rattenmodellen bewiesenen anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen sowie pro-regenerativen Fähigkeiten im Schwein zu bestätigen. Nur so ist eine Abschätzung von Nutzen und Risiken für die spätere Anwendung in klinischen Studien möglich. Dazu hat die vorliegende Arbeit die Grundlagen gelegt.

## 6 Zusammenfassung

Wie die Organtransplantation bedarf die klinische Hepatozytentransplantation der Immunsuppression. Im Rattenmodell wurden allogene, über die Portalvene applizierte Hepatozyten T-Zell-vermittelt abgestoßen. Die Abstoßungsreaktion konnte durch Cyclosporin A am effektivsten verhindert werden, da es nicht, wie andere Immunsuppressiva (z.B. Mycophenolat), als Proliferationshemmer wirkt, die auch die Proliferation der Spenderhepatozyten hemmen und so deren wirksame Vermehrung verhindern. Neben der immunsuppressiven Wirkung erhöhte Cyclosporin A auch die Integrationsrate von Spenderhepatozyten in das Empfängerparenchym. Dieser pharmakologische Effekt des Cyclosporins war wahrscheinlich auf die Auflockerung der Endothelbarriere zurückzuführen, die den Eintritt der transplantierten Zellen erleichterte. Leberresidente Makrophagen waren nicht maßgeblich an der Abstoßungsreaktion beteiligt.

Als Alternative zur Hepatozytentransplantation wurde der therapeutische Nutzen von aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) hergestellten, hepatozytären Zellen in murinen Modellen der akuten und der chronischen Leberschädigung untersucht. Beim durch Paracetamol induzierten akuten Leberschaden wirkten die hepatozytär differenzierten MSC sowohl im syngenen Rattenmodell als auch im xenogen Mausmodell hepatoprotektiv auf Grund ihrer pro-proliferativen und anti-apoptischen Eigenschaften. Zusätzlich wurde ihr „Homing“ in die geschädigte Leber nach systemischer Applikation beobachtet. Auch im Modell der chronischen Leberschädigung konnte nach systemischer Applikation gezeigt werden, dass die Zellen in das geschädigte Lebergewebe einwanderten (Migration). Dort wirkten sie anti-fibrotisch, wodurch sich die hämodynamischen Komplikationen der Leberzirrhose verbesserten und somit eine Reduktion des erhöhten portalvenösen Druck erreicht wurde, eine der hauptverantwortlichen Ursachen von Komplikation bei der Leberzirrhose. Diese Befunde belegen klar den therapeutischen Nutzen von hepatozytär differenzierten MSC. Zur Übertragbarkeit auf eine mögliche klinische Anwendung ist die Testung der pharmakologischen und technischen Machbarkeit (Toxizität, Applikationswege) im Großtier unabdingbar. Daher wurden im dritten Teil der Arbeit MSC aus porcinem Knochenmark und aus viszeralem sowie subkutanem Fettgewebe isoliert und ihre hepatozytäre Differenzierungsfähigkeit getestet. Die Zellen speicherten Glykogen, synthetisierten Harnstoffsynthese und wiesen Cytochrom P450-Aktivität nach



hepatogener Differenzierung auf, sämtlich spezifische Eigenschaften von adulten Hepatozyten. Damit stehen diese Zellen uneingeschränkt für die präklinische Testung im Schwein zur Verfügung.

Insgesamt hat diese Arbeit also den Beleg erbracht, dass MSC eine mögliche Alternative zu Hepatozyten für die Zelltherapie bei akuten und chronischen Lebererkrankungen sein können. Für die prä-klinische Evaluation stehen gesicherte Modelle sowohl im Nager- als auch im Großtiermodell zur Verfügung. Die Befunde dieser Arbeit haben auch ein Immunsuppressionsregime erbracht, das die Spenderzellintegration ins Wirtsparenchym der Empfängerleber verbessert.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Geerts, A., *History, heterogeneity, developmental biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells*. Seminars in liver disease, 2001. **21**(3): p. 311-35.
2. Higgins GW, A.R., *Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal*. Arch Pathol, 1931. **12**: p. 186-202.
3. Baddour, J.A., K. Sousounis, P.A. Tsonis, *Organ repair and regeneration: an overview*. Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews, 2012. **96**(1): p. 1-29.
4. Fausto, N., J.S. Campbell, *The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation*. Mechanisms of development, 2003. **120**(1): p. 117-30.
5. Farber, J.L., S.K. El-Mofty, *The biochemical pathology of liver cell necrosis*. The American journal of pathology, 1975. **81**(1): p. 237-50.
6. Fausto, N., *Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells*. Hepatology, 2004. **39**(6): p. 1477-87.
7. Dabeva, M.D., D.A. Shafritz, *Activation, proliferation, and differentiation of progenitor cells into hepatocytes in the D-galactosamine model of liver regeneration*. The American journal of pathology, 1993. **143**(6): p. 1606-20.
8. Sell, S., H.L. Leffert, H. Shinozuka, et al., *Rapid development of large numbers of alpha-fetoprotein-containing "oval" cells in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetylamide in a choline-devoid diet*. Gann = Gan, 1981. **72**(4): p. 479-87.
9. Evarts, R.P., P. Nagy, E. Marsden, et al., *A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver*. Carcinogenesis, 1987. **8**(11): p. 1737-40.
10. Spee, B., G. Carpino, B.A. Schotanus, et al., *Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling*. Gut, 2010. **59**(2): p. 247-57.
11. Moyer, T.P., W.E. Highsmith, T.C. Smyrk, et al., *Hereditary hemochromatosis: laboratory evaluation*. Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2011. **412**(17-18): p. 1485-92.
12. Ala, A., A.P. Walker, K. Ashkan, et al., *Wilson's disease*. Lancet, 2007. **369**(9559): p. 397-408.
13. Bosma, P.J., J. Seppen, B. Goldhoorn, et al., *Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 is the only relevant bilirubin glucuronidating isoform in man*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(27): p. 17960-4.
14. Czaja, A.J., *Autoimmune hepatitis. Evolving concepts and treatment strategies*. Digestive diseases and sciences, 1995. **40**(2): p. 435-56.
15. Lee, W.M., *Acute liver failure*. Seminars in respiratory and critical care medicine, 2012. **33**(1): p. 36-45.
16. Jungermann, K., T. Kietzmann, *Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver*. Hepatology, 2000. **31**(2): p. 255-60.
17. Christ, B., S. Bruckner, *Rodent animal models for surrogate analysis of cell therapy in acute liver failure*. Frontiers in physiology, 2012. **3**: p. 78.
18. Rumack, B.H., D.N. Bateman, *Acetaminophen and acetylcysteine dose and duration: past, present and future*. Clinical toxicology, 2012. **50**(2): p. 91-8.
19. Bahr, M.J., M.P. Manns, *[Liver cirrhosis]*. Der Internist, 1999. **40**(12): p. 1308-22.
20. Zhou, J., Z. Wu, P. Pankaj, et al., *Long-term postoperative outcomes of hypersplenism: laparoscopic versus open splenectomy secondary to liver cirrhosis*. Surgical endoscopy, 2012. **26**(12): p. 3391-400.
21. Child, C.G., J.G. Turcotte, *Surgery and portal hypertension*. Major problems in clinical surgery, 1964. **1**: p. 1-85.
22. Grattagliano, I., E. Ubaldi, L. Bonfrate, et al., *Management of liver cirrhosis between primary care and specialists*. World journal of gastroenterology : WJG, 2011. **17**(18): p. 2273-82.
23. Strassburg, C.P., M.J. Bahr, T. Becker, et al., *[Progress in immunosuppression]*. Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin, 2008. **79**(2): p. 149-56.
24. Cohn, R.G., A. Mirkovich, B. Dunlap, et al., *Mycophenolic acid increases apoptosis, lysosomes and lipid droplets in human lymphoid and monocytic cell lines*. Transplantation, 1999. **68**(3): p. 411-8.

25. Dubinsky, M.C., *Azathioprine, 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease: pharmacology, efficacy, and safety*. Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association, 2004. **2**(9): p. 731-43.
26. Parekh, K., E. Trulock, G.A. Patterson, *Use of cyclosporine in lung transplantation*. Transplantation proceedings, 2004. **36**(2 Suppl): p. 318S-322S.
27. Kasap, B., *Sirolimus in pediatric renal transplantation*. Pediatric transplantation, 2011. **15**(7): p. 673-85.
28. Sanchez-Fructuoso, A.I., *Everolimus: an update on the mechanism of action, pharmacokinetics and recent clinical trials*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2008. **4**(6): p. 807-19.
29. Hirose, R., F. Vincenti, *Immunosuppression: today, tomorrow, and withdrawal*. Seminars in liver disease, 2006. **26**(3): p. 201-10.
30. Laconi, E., R. Oren, D.K. Mukhopadhyay, et al., *Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine*. The American journal of pathology, 1998. **153**(1): p. 319-29.
31. Wachsmuth, E.D., P. Donner, *Conclusions about aminopeptidase in tissue sections from studies of amino acid naphthylamide hydrolysis*. Histochemistry, 1976. **47**(4): p. 271-83.
32. Lin, G., Y.Y. Cui, E.M. Hawes, *Microsomal formation of a pyrrolic alcohol glutathione conjugate of clivorine. Firm evidence for the formation of a pyrrolic metabolite of an otonecine-type pyrrolizidine alkaloid*. Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals, 1998. **26**(2): p. 181-4.
33. Malhi, H., B. Joseph, M.L. Schilsky, et al., *Development of cell therapy strategies to overcome copper toxicity in the LEC rat model of Wilson disease*. Regenerative medicine, 2008. **3**(2): p. 165-73.
34. Groth, C.G., B. Arborgh, C. Bjorken, et al., *Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation*. Transplantation proceedings, 1977. **9**(1): p. 313-6.
35. Azuma, H., N. Paulk, A. Ranade, et al., *Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice*. Nature biotechnology, 2007. **25**(8): p. 903-10.
36. Fox, I.J., J.R. Chowdhury, S.S. Kaufman, et al., *Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation*. The New England journal of medicine, 1998. **338**(20): p. 1422-6.
37. Cantor, H.M., A.E. Dumont, *Hepatic suppression of sensitization to antigen absorbed into the portal system*. Nature, 1967. **215**(5102): p. 744-5.
38. Zuk, P.A., M. Zhu, P. Ashjian, et al., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. Molecular biology of the cell, 2002. **13**(12): p. 4279-95.
39. Jones, E.A., A. English, K. Henshaw, et al., *Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis*. Arthritis and rheumatism, 2004. **50**(3): p. 817-27.
40. Pittenger, M.F., A.M. Mackay, S.C. Beck, et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
41. Friedenstein, A.J., J.F. Gorskaja, N.N. Kulagina, *Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs*. Experimental hematology, 1976. **4**(5): p. 267-74.
42. Bruder, S.P., N.S. Ricalton, R.E. Boynton, et al., *Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation*. Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 1998. **13**(4): p. 655-63.
43. Barry, F., R. Boynton, M. Murphy, et al., *The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2001. **289**(2): p. 519-24.
44. Vogel, W., F. Grunebach, C.A. Messam, et al., *Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells*. Haematologica, 2003. **88**(2): p. 126-33.
45. Xu, W., X. Zhang, H. Qian, et al., *Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro*. Experimental biology and medicine, 2004. **229**(7): p. 623-31.
46. Le Blanc, K., I. Rasmusson, B. Sundberg, et al., *Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells*. Lancet, 2004. **363**(9419): p. 1439-41.

47. Krampera, M., S. Glennie, J. Dyson, et al., *Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3722-9.
48. van Poll, D., B. Parekkadan, C.H. Cho, et al., *Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo*. Hepatology, 2008. **47**(5): p. 1634-43.
49. Krampera, M., A. Pasini, G. Pizzolo, et al., *Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells*. Current opinion in pharmacology, 2006. **6**(4): p. 435-41.
50. Vassilopoulos, G., P.R. Wang, D.W. Russell, *Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion*. Nature, 2003. **422**(6934): p. 901-4.
51. Wang, X., H. Willenbring, Y. Akkari, et al., *Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes*. Nature, 2003. **422**(6934): p. 897-901.
52. Willenbring, H., A.S. Bailey, M. Foster, et al., *Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver*. Nature medicine, 2004. **10**(7): p. 744-8.
53. Phinney, D.G., D.J. Prockop, *Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views*. Stem cells, 2007. **25**(11): p. 2896-902.
54. Liu, Z.J., Y. Zhuge, O.C. Velazquez, *Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells*. Journal of cellular biochemistry, 2009. **106**(6): p. 984-91.
55. Lange, C., P. Bassler, M.V. Lioznov, et al., *Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells*. Transplantation proceedings, 2005. **37**(1): p. 276-9.
56. Wang, P.P., J.H. Wang, Z.P. Yan, et al., *Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction*. Biochemical and biophysical research communications, 2004. **320**(3): p. 712-6.
57. Schwartz, R.E., M. Reyes, L. Koodie, et al., *Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells*. The Journal of clinical investigation, 2002. **109**(10): p. 1291-302.
58. Talens-Visconti, R., A. Bonora, R. Jover, et al., *Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells*. World journal of gastroenterology : WJG, 2006. **12**(36): p. 5834-45.
59. Lee, K.D., T.K. Kuo, J. Whang-Peng, et al., *In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells*. Hepatology, 2004. **40**(6): p. 1275-84.
60. Hong, S.H., E.J. Gang, J.A. Jeong, et al., *In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **330**(4): p. 1153-61.
61. Seo, M.J., S.Y. Suh, Y.C. Bae, et al., *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **328**(1): p. 258-64.
62. Banas, A., T. Teratani, Y. Yamamoto, et al., *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes*. Hepatology, 2007. **46**(1): p. 219-28.
63. Aurich, I., L.P. Mueller, H. Aurich, et al., *Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers*. Gut, 2007. **56**(3): p. 405-15.
64. Banas, A., T. Teratani, Y. Yamamoto, et al., *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2009. **24**(1): p. 70-7.
65. Sgodda, M., H. Aurich, S. Kleist, et al., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo*. Experimental cell research, 2007. **313**(13): p. 2875-86.
66. Aurich, H., M. Sgodda, P. Kaltwasser, et al., *Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo*. Gut, 2009. **58**(4): p. 570-81.
67. Parekkadan, B., D. van Poll, K. Suganuma, et al., *Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure*. PloS one, 2007. **2**(9): p. e941.
68. Petersen, B.E., W.C. Bowen, K.D. Patrene, et al., *Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells*. Science, 1999. **284**(5417): p. 1168-70.
69. Stock, P., S. Bruckner, S. Ebensing, et al., *The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver*. Nature protocols, 2010. **5**(4): p. 617-27.
70. Aller, M.A., N. Arias, I. Prieto, et al., *A half century (1961-2011) of applying microsurgery to experimental liver research*. World journal of hepatology, 2012. **4**(7): p. 199-208.
71. Seglen, P.O., *Preparation of isolated rat liver cells*. Methods in cell biology, 1976. **13**: p. 29-83.

72. Crocker, C.L., *Rapid determination of urea nitrogen in serum or plasma without deproteinization*. The American journal of medical technology, 1967. **33**(5): p. 361-5.
73. Walldorf, J., C. Hillebrand, H. Aurich, et al., *Propranolol impairs liver regeneration after partial hepatectomy in C57Bl/6-mice by transient attenuation of hepatic lipid accumulation and increased apoptosis*. Scandinavian journal of gastroenterology, 2010. **45**(4): p. 468-76.
74. Joseph, B., H. Malhi, K.K. Bhargava, et al., *Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver*. Gastroenterology, 2002. **123**(5): p. 1677-85.
75. Wisse, E., Knook, D.L., and McCuskey, R.S., ed. *Cells of the Hepatic Sinusoid*. Selective depletion of Kupffer cells after intravenous injection of gadoliniumchloride, ed. J. Koudstaal, Dijkhuis, F.W.J., and Hardonk, M.J. Vol. 3. 1991, The Kupffer Cell Foundation: Rijswijk.
76. Malhi, H., P. Annamaneni, S. Slehria, et al., *Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver*. Hepatology, 2002. **36**(1): p. 112-21.
77. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
78. Sohni, A., C.M. Verfaillie, *Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking*. Stem cells international, 2013. **2013**: p. 130763.
79. Ju, S., G.J. Teng, H. Lu, et al., *In vivo MR tracking of mesenchymal stem cells in rat liver after intrasplenic transplantation*. Radiology, 2007. **245**(1): p. 206-15.
80. Fox, I.J., J.R. Chowdhury, *Hepatocyte transplantation*. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2004. **4 Suppl 6**: p. 7-13.
81. Lee, S.W., X. Wang, N.R. Chowdhury, et al., *Hepatocyte transplantation: state of the art and strategies for overcoming existing hurdles*. Annals of hepatology, 2004. **3**(2): p. 48-53.
82. Koenig, S., H. Aurich, C. Schneider, et al., *Zonal expression of hepatocytic marker enzymes during liver repopulation*. Histochemistry and cell biology, 2007. **128**(2): p. 105-14.
83. Boesch, D., C. Gaveriaux, B. Jachez, et al., *In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833*. Cancer research, 1991. **51**(16): p. 4226-33.
84. Satake, K., J. Lou, L.G. Lenke, *Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue*. Spine, 2004. **29**(18): p. 1971-9.
85. Herrera, M.B., B. Bussolati, S. Bruno, et al., *Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury*. Kidney international, 2007. **72**(4): p. 430-41.
86. Ratajczak, M.Z., M. Kucia, T. Jadczyk, et al., *Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies?* Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K, 2012. **26**(6): p. 1166-73.
87. Collino, F., M.C. Deregis, S. Bruno, et al., *Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs*. PloS one, 2010. **5**(7): p. e11803.
88. Iso, Y., J.L. Spees, C. Serrano, et al., *Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment*. Biochemical and biophysical research communications, 2007. **354**(3): p. 700-6.
89. Ito, Y., E.R. Abril, N.W. Bethea, et al., *Inhibition of matrix metalloproteinases minimizes hepatic microvascular injury in response to acetaminophen in mice*. Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology, 2005. **83**(1): p. 190-6.
90. Christ, B., P. Stock, *Mesenchymal stem cell-derived hepatocytes for functional liver replacement*. Frontiers in immunology, 2012. **3**: p. 168.
91. More, A.S., R.R. Kumari, G. Gupta, et al., *Effect of S-methylisothiourea in acetaminophen-induced hepatotoxicity in rat*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2012. **385**(11): p. 1127-39.
92. Madhavan, V., A.S. Pandey, A. Murali, et al., *Protective effects of Capparis sepiaria root extracts against acetaminophen-induced hepatotoxicity in Wistar rats*. Journal of complementary & integrative medicine, 2012. **9**: p. Article 1.
93. Mihas, A.A., V.K. Kanji, T.A. Mihas, et al., *Fructose diphosphate attenuates the acetaminophen-induced liver injury in the rat evidence for involvement of nitric oxide*. Research communications in molecular pathology and pharmacology, 2003. **113-114**: p. 253-66.

94. Kim, S.T., J.D. Kim, S.H. Ahn, et al., *Hepatoprotective and antioxidant effects of Alnus japonica extracts on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats*. *Phytotherapy research : PTR*, 2004. **18**(12): p. 971-5.
95. Garba, S.H., N. Sambo, U. Bala, *The effect of the aqueous extract of Kohautia grandiflora on paracetamol-induced liver damage in albino rats*. *Nigerian journal of physiological sciences : official publication of the Physiological Society of Nigeria*, 2009. **24**(1): p. 17-23.
96. McGill, M.R., C.D. Williams, Y. Xie, et al., *Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity*. *Toxicology and applied pharmacology*, 2012. **264**(3): p. 387-94.
97. Salomone, F., I. Barbagallo, L. Puzzo, et al., *Efficacy of adipose tissue-mesenchymal stem cell transplantation in rats with acetaminophen liver injury*. *Stem cell research*, 2013. **11**(3): p. 1037-44.
98. Abdel Aziz, M.T., H.M. Atta, S. Mahfouz, et al., *Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis*. *Clinical biochemistry*, 2007. **40**(12): p. 893-9.
99. Zhao, W., J.J. Li, D.Y. Cao, et al., *Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis*. *World journal of gastroenterology : WJG*, 2012. **18**(10): p. 1048-58.
100. Oliveira-Sales, E.B., E. Maquigussa, P. Semedo, et al., *Mesenchymal Stem Cells (MSC) Prevented the Progression of Renovascular Hypertension, Improved Renal Function and Architecture*. *PloS one*, 2013. **8**(11): p. e78464.
101. Jandl, J.H., R.H. Aster, C.E. Forkner, et al., *Splenic pooling and the pathophysiology of hypersplenism*. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 1967. **78**: p. 9-27.
102. Nowatari, T., S. Murata, K. Fukunaga, et al., *Role of platelets in chronic liver disease and acute liver injury*. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*, 2013.
103. Lei, Z., L. Yongda, M. Jun, et al., *Culture and neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro*. *Cell biology international*, 2007. **31**(9): p. 916-23.
104. Ye, N.S., J. Chen, G.A. Luo, et al., *Proteomic profiling of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced by 5-azacytidine*. *Stem cells and development*, 2006. **15**(5): p. 665-76.
105. Choi, E.W., I.S. Shin, S.Y. Park, et al., *Characteristics of mouse adipose tissue-derived stem cells and therapeutic comparison between syngeneic and allogeneic adipose tissue-derived stem cell transplantation in experimental autoimmune thyroiditis*. *Cell transplantation*, 2013.
106. Eslaminejad, M.B., S. Nadri, *Murine mesenchymal stem cell isolated and expanded in low and high density culture system: surface antigen expression and osteogenic culture mineralization*. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 2009. **45**(8): p. 451-9.
107. Tropel, P., D. Noel, N. Platet, et al., *Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow*. *Experimental cell research*, 2004. **295**(2): p. 395-406.
108. Mareschi, K., E. Biasin, W. Piacibello, et al., *Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood*. *Haematologica*, 2001. **86**(10): p. 1099-100.
109. Bosch, P., S.L. Pratt, S.L. Stice, *Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells*. *Biology of reproduction*, 2006. **74**(1): p. 46-57.
110. Kumar, G., H. Hara, C. Long, et al., *Adipose-derived mesenchymal stromal cells from genetically modified pigs: immunogenicity and immune modulatory properties*. *Cytotherapy*, 2012. **14**(4): p. 494-504.
111. Monaco, E., M. Bionaz, S. Rodriguez-Zas, et al., *Transcriptomics comparison between porcine adipose and bone marrow mesenchymal stem cells during in vitro osteogenic and adipogenic differentiation*. *PloS one*, 2012. **7**(3): p. e32481.
112. Groth, A., S. Ottinger, C. Kleist, et al., *Evaluation of porcine mesenchymal stem cells for therapeutic use in human liver cancer*. *International journal of oncology*, 2012. **40**(2): p. 391-401.
113. Ali, G., S. Mohsin, M. Khan, et al., *Nitric oxide augments mesenchymal stem cell ability to repair liver fibrosis*. *Journal of translational medicine*, 2012. **10**: p. 75.
114. Fang, B., M. Shi, L. Liao, et al., *Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice*. *Transplantation*, 2004. **78**(1): p. 83-8.
115. Sato, Y., H. Araki, J. Kato, et al., *Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion*. *Blood*, 2005. **106**(2): p. 756-63.
116. Yukawa, H., H. Noguchi, K. Oishi, et al., *Cell transplantation of adipose tissue-derived stem cells in combination with heparin attenuated acute liver failure in mice*. *Cell transplantation*, 2009. **18**(5): p. 611-8.

117. Hengstler, J.G., M. Brulport, W. Schormann, et al., *Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte*. Expert opinion on drug metabolism & toxicology, 2005. **1**(1): p. 61-74.
118. Vinken, M., T. Vanhaecke, V. Rogiers, *Primary hepatocyte cultures as in vitro tools for toxicity testing: quo vadis?* Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA, 2012. **26**(3): p. 541-4.
119. Schneider, C., H. Aurich, R. Wenkel, et al., *Propagation and functional characterization of serum-free cultured porcine hepatocytes for downstream applications*. Cell and tissue research, 2006. **323**(3): p. 433-42.
120. Aurich, H., S. Koenig, C. Schneider, et al., *Functional characterization of serum-free cultured rat hepatocytes for downstream transplantation applications*. Cell transplantation, 2005. **14**(7): p. 497-506.
121. Barry, F.P., R.E. Boynton, S. Haynesworth, et al., *The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)*. Biochemical and biophysical research communications, 1999. **265**(1): p. 134-9.
122. Banas, A., *Purification of adipose tissue mesenchymal stem cells and differentiation toward hepatic-like cells*. Methods in molecular biology, 2012. **826**: p. 61-72.
123. Hughes, R.D., R.R. Mitry, A. Dhawan, *Current status of hepatocyte transplantation*. Transplantation, 2012. **93**(4): p. 342-7.
124. Dhawan, A., J. Puppi, R.D. Hughes, et al., *Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges*. Nature reviews. Gastroenterology & hepatology, 2010. **7**(5): p. 288-98.
125. Kung, J.W., I.S. Currie, S.J. Forbes, et al., *Liver development, regeneration, and carcinogenesis*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010. **2010**: p. 984248.
126. Li, J., M. Li, B. Niu, et al., *Therapeutic potential of stem cell in liver regeneration*. Frontiers of medicine, 2011. **5**(1): p. 26-32.
127. Schwartz, R.E., C. Verfaillie, *Hepatic stem cells*. Methods in molecular biology, 2010. **640**: p. 167-79.
128. Gennero, L., M.A. Roos, K. Sperber, et al., *Pluripotent plasticity of stem cells and liver repopulation*. Cell biochemistry and function, 2010. **28**(3): p. 178-89.
129. Thiel, C., K. Thiel, A. Etspueler, et al., *A reproducible porcine model of acute liver failure induced by intrajejunal acetaminophen administration*. European surgical research. Europäische chirurgische Forschung. Recherches chirurgicales europeennes, 2011. **46**(3): p. 118-26.
130. Arkadopoulos, N., G. Defterevos, C. Nastos, et al., *Development of a porcine model of post-hepatectomy liver failure*. The Journal of surgical research, 2011. **170**(2): p. e233-42.

## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. H.-H. Kaatz für die Betreuung meiner Arbeit innerhalb der Naturwissenschaftlichen Fakultät I bedanken. Bei Prof. B. Christ möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe anfertigen zu können, sowie für die Überlassung des interessanten Themas und die ständigen wissenschaftlichen Diskussionen während der Arbeit bedanken. Mein Dank gilt ebenfalls der gesamten Arbeitsgruppe Angewandte Molekulare Hepatologie, die stets und ständig zur Diskussion bereit war und mir unglaublich ans Herz gewachsen ist. Besonders hervorheben möchte ich die MTLA Madlen Hempel, ohne ihre tatkräftige Unterstützung vor allem bei den tierexperimentellen Arbeiten, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ganz besonderen Dank auch dafür, dass du immer ein offenes Ohr für mich hast, in allen Dingen!

Meinen Eltern möchte ich ganz besonders danken für die Unterstützung in allen Lebenslagen, es ist schön zu wissen, dass Ihr immer für mich da seid.

Bei meinen Freunden und ehemaligen Studienkollegen, Kati Richter, Claudia Doberenz, Jessika Wacker, Anja Buttstedt und Silvio Erler möchte ich mich nicht nur für die gemeinsamen Unternehmungen und Urlaube weit über die Studienzeit hinaus bedanken. Ich möchte auch Danke sagen für die unzähligen Skype- Abende, die mich fast vergessen lassen, dass wir so weit voneinander entfernt leben. Besonders hervorheben möchte ich Anja Buttstedt und Silvio Erler, mit denen ich so gern und häufig über die Wissenschaft diskutiere und die so emsig diese Arbeit Korrektur gelesen haben!

Danke möchte ich auch Michael sagen, der fast die ganze Promotionszeit an meiner Seite war, ich werde dich immer im Herzen tragen, deine Motte!



## 9 Eigene Veröffentlichungen

1. *The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver*  
P Stock, **S Brückner**, S Ebensing, M Hempel, MM Dollinger, B Christ  
Nature Protocols 5 (4), 617-627, 2010
2. *Hepatic transplantation of mesenchymal stem cells in rodent animal models*  
B Christ, **S Brückner**, P Stock  
Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications, 315-330, 2011
3. *A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation*  
S Pelz, P Stock, **S Brückner**, B Christ  
Experimental Cell Research 318 (3), 276-287, 2012
4. *Rodent animal models for surrogate analysis of cell therapy in acute liver failure*  
B Christ, **S Brückner**  
Frontiers in Physiology 3, 78, 2012
5. *Isolation and Hepatocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Porcine Bone Marrow—“Surgical Waste” as a Novel MSC Source*  
**S Brückner**, HM Tautenhahn, S Winkler, P Stock, S Jonas, M Dollinger, B Christ  
Transplantation proceedings 45 (5), 2056-2058, 2013
6. *A fat Option for the pig: Hepatocytic differentiated mesenchymal stem cells for translational research*  
**S Brückner**, HM Tautenhahn, S Winkler, P Stock, S Jonas, M Dollinger, B Christ  
Experimental Cell Research, 2013 Nov 4. pii: S0014-4827(13)00468-0. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.018.

## ■ Persönliche Daten

Name: Sandra Brückner  
Geburtsdaten: 24.06.1982  
Mutter: Dagmar Brückner, geb. 24.12.58  
Vater: Volker Brückner, geb. 26.08.58

## ■ Schulbildung

1989 – 1993 Pestalozzi Grundschule Bitterfeld  
1993 – 2002 Europagymnasium „Walther-Rathenau“ Bitterfeld  
Abschluss: Abitur 2,1

## ■ Studium

2002 – 2007 Biologie-Studium an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfach: Genetik  
Nebenfach: Biochemie  
Nebenfach: Immunologie

2007 Anfertigung der Diplomarbeit im Fachbereich Genetik  
der Martin-Luther Universität in der Arbeitsgruppe  
Entwicklungsgenetik von Prof. Dr. Gunter Reuter

17.12 2007 Abschluss: Dipl. Biologin 1,4

2008-bis jetzt Doktorandin  
AG Prof. Christ  
Angewandte Molekulare Hepatologie

## ■ Veröffentlichungen

1. *The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver*  
P Stock, **S Brückner**, S Ebensing, M Hempel, MM Dollinger, B Christ  
Nature protocols 5 (4), 617-627, 2010
2. *Hepatic transplantation of mesenchymal stem cells in rodent animal models*  
B Christ, **S Brückner**, P Stock  
Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications, 315-330, 2011
3. *A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation*  
S Pelz, P Stock, **S Brückner**, B Christ  
Experimental Cell Research 318 (3), 276-287, 2012
4. *Rodent animal models for surrogate analysis of cell therapy in acute liver failure*  
B Christ, **S Brückner**  
Frontiers in physiology 3, 78, 2012

5. *Isolation and Hepatocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Porcine Bone Marrow—“Surgical Waste” as a Novel MSC Source*  
**S Brückner**, HM Tautenhahn, S Winkler, P Stock, S Jonas, M Dollinger, B Christ  
Transplantation proceedings 45 (5), 2056-2058, 2013
  
6. *A fat Option for the pig: Hepatocytic differentiated mesenchymal stem cells for translational research*  
**S Brückner**, HM Tautenhahn, S Winkler, P Stock, S Jonas, M Dollinger, B Christ  
Experimental Cell Research, 2013 Nov 4. pii: S0014-4827(13)00468-0. doi:  
 10.1016/j.yexcr.2013.10.018.

#### ■ Auszeichnungen

- 15. Leipziger Workshop “Cytomics”  
**Poster Award**  
 2010  
 “Hepatic differentiated mesenchymal stem cells migrate to centre of inflammation after tail vein application in the rat model”
  
- 26. Jährliche Meeting der GASL (German Society for the Study of the Liver)  
**Poster Award**  
 2010  
 „T-Zellen vermitteln die Abstoßung transplantiertter allogener Hepatozyten“

#### ■ Keynote Lecture

- 16. Leipziger Workshop “Cytomics”  
 2011  
 “Quantification of hepatic cell transplants”

#### ■ Vorträge auf Einladung

- 47. Annual Meeting of EASL (European Association for the study of the liver)  
 2012  
**State-of-the-Art-Mesenchymal Stem cell therapies and the liver-** “hMSC as a novel treatment for acetaminophen- (APAP-) induced acute liver injury  
 Experience from the mouse model”
  
- 1. Virtual liver network meeting  
 2012  
**Hepatocyte transplantation - a virtual model**
  
- 24. Workshop für klinische und experimentelle Lebertransplantation und Hepatologie  
 2013  
**Systemisch applizierte mesenchymale Stammzellen vermindern die Fibrose im Rattenmodell der CCl<sub>4</sub>-induzierten Leberzirrhose**
  
- Wilsede 2012  
 2013  
**State-of-the-Art-Mesenchymal Stem cell therapies and the liver-** “hMSC as a novel treatment for acetaminophen- (APAP-) induced acute liver injury  
 Experience from the mouse model”

## ■ Poster

- 25. Jährliche Meeting der GASL (German Association for the Study of the Liver)  
2009  
Etablierung eines allogenen Hepatozyten Transplantationsmodells zur Untersuchung der immunologischen Abstoßungsreaktion
- 20. Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie  
2009  
Erfassung Leberspezifischer Genexpression durch Sandwich-Hybridisierungsassay
- 26. Jährliche Meeting der GASL (German Association for the Study of the Liver)  
2010  
T-Zellen vermitteln die Abstoßung transplantiertter allogener Hepatozyten
- 21. Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie  
2010  
Cyclosporin begünstigt die Integration syngener, transplantiertter Hepatozyten in der Rattenleber
- 27. Jährliche Meeting der GASL (German Association for the Study of the Liver)  
2011  
Nachweis und Quantifizierung transplantiertter, hepatozytär differenzierter, humaner mesenchymaler Stammzellen bei NASH in der immundefizienten Maus
- 22. Workshop für experimentelle und klinische Lebertransplantation und Hepatologie  
2011  
Immunsuppressive Strategien nach allogener Hepatozytentransplantation im Rattenmodell
- 28. Jährliche Meeting der GASL (German Association for the Study of the Liver)  
2012  
MSCs augment liver regeneration after paracetamol – induced acute liver injury by their anti-apoptotic and pro-proliferative mode of action
- American Transplant Congress (ATC) 2012  
2012  
Mesenchymal stem cells from porcine bone marrow of the *Os femoris* and the *Crista iliaca*
- 29. Jährliche Meeting der GASL (German Association for the Study of the Liver)  
2013  
Systemisch applizierte mesenchymale Stammzellen vermindern die Fibrose im Rattenmodell der CCl<sub>4</sub>-induzierten Leberzirrhose

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass diese Arbeit von mir bisher weder an der Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zweck der Promotion eingereicht wurde.

Ich erkläre weiterhin, dass ich mich bisher noch nicht um den Doktorgrad beworben habe.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.



Sandra Brückner