

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

*„Vergleichende in vivo- und in vitro-Analysen im Rahmen der Etablierung der kombinierten
Leber- und Leberzelltransplantation im Rattenmodell“*

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Schröder

aus Halle/Saale

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	- 6 -
Summary	- 8 -
1. Einleitung	- 9 -
1.1 Die Leber	- 9 -
1.2 Die Entwicklung der Lebertransplantation.....	- 9 -
1.2.1 Chirurgische und allgemein-klinische Aspekte	- 9 -
1.2.2 Aspekte der Immunsuppression.....	- 10 -
1.3 Aktueller Stand in Klinik und Forschung	- 11 -
1.4 Klinisches Ziel	- 12 -
1.5 Grundlage der Versuche im Tiermodell	- 13 -
1.6 Etablierungsarbeiten	- 15 -
1.6.1 Blockierung des Zellzyklus im allogenen Spenderorgan	- 15 -
1.6.2 Proliferationsaktivierung hepatischer Vorläuferzellen des Zellspenders	- 15 -
1.6.3 Etablierung eines Zellisolierungsprotokolls für hepatische Progenitorzellen	- 16 -
1.6.4 Zellkulturversuche in Hepatocyten-Kultur.....	- 17 -
1.6.5 Etablierung und Vergleich von Methoden zum Nachweis syngener Spenderzellen in der allogenen Transplantatleber und deren Repopularisierungs-potential	- 17 -
1.7 Zusammenfassende Zielsetzung.....	- 18 -
1.7.1 Vorversuche zur Literaturvalidierung	- 18 -
1.7.2 Hauptversuche	- 18 -
2. Methoden.....	- 19 -
2.1 Tierexperimentelle Eingriffe.....	- 19 -
2.1.1 Tierhaltung und Schmerzmanagement.....	- 19 -
2.1.2 2-AAF-Applikation und partielle Hepatektomie bei Lew-m Tieren.....	- 19 -
2.1.3 Leberexplantation von vorbehandelten Lew-m Tieren	- 20 -
2.1.4 Retrorsin-Applikation in weibliche DA Tiere	- 21 -
2.1.5 Leberexplantation von vorbehandelten DA Tieren.....	- 21 -
2.1.6 Orthotope Lebertransplantation und Leberzelltransplantation bei Lew-f	- 21 -
2.1.7 Immunsuppression	- 22 -
2.1.8 Gruppeneinteilung, Finalisierung und Gewebeprobengewinnung.....	- 22 -
2.2 Leberzellisolierung	- 24 -
2.2.1 Isolierung adulter Hepatocyten.....	- 24 -
2.2.2 Isolierung nicht-parenchymaler hepatischer Vorläuferzellen.....	- 26 -
2.3 Zellkulturversuche und Laboranalysen.....	- 27 -
2.3.1 Hepatocyten-Kultur und Hepatocyten-Vorläuferzellen-Kokultur	- 27 -

2.3.2	Laboranalysen der Mediumproben	- 28 -
2.4	Histologische Methoden und Immunhistochemie	- 28 -
2.4.1	Paraffin-Schnittmethode.....	- 28 -
2.4.2	Hämatoxylin-Eosin(HE)-Übersichtsfärbungen	- 29 -
2.4.3	Proliferationsnachweis innerhalb der Zellspenderorgane durch Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)-Markierung	- 29 -
2.4.4	Nachweis hepatischer Vorläuferzellen innerhalb der Zellspenderorgane durch OV-6 Markierung	- 30 -
2.4.5	Y-Chromosomendetektion mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	- 30 -
2.5	Y-Chromosomendetektion mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)	- 32 -
2.5.1	Isolation genomischer DNA aus formalin-fixiertem, paraffinisiertem Lebergewebe....	- 33 -
2.5.2	DNA-Konzentrations-Bestimmung	- 34 -
2.5.3	Y-Chromosomen-Quantitätsbestimmung durch SRY-qPCR	- 34 -
3.	Ergebnisse.....	- 36 -
3.1	Orthotope Lebertransplantation und Leberzelltranplantation	- 36 -
3.2	Leberzellisolierung von Lew m.....	- 36 -
3.3	Ergebnisse der Zellkulturversuche	- 38 -
3.3.1	Hepatocytenisolierungen für Zellkulturanalysen	- 38 -
3.3.2	Auswertung der Laboranalysen der Hepatocyten-Kulturen	- 38 -
3.4	Immunhistochemische Analysen und Histologie	- 40 -
3.4.1	Proliferationsanalysen Retrorsin-behandelter DA-Tiere	- 40 -
3.4.2	Ermittlung des Isolierungszeitpunktes für Leberzellen aus Zellspendertieren	- 41 -
3.5	Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH)	- 42 -
3.5.1	Auswertung der Einzeltiere nach Gruppen geordnet	- 44 -
3.5.2	Gruppenübergreifende Auswertung der FisH-Ergebnisse.....	- 46 -
3.6	Auswertung der qPCR zur Y-Chromosomendetektion.....	- 47 -
3.6.1	Auswertung der Einzeltiere nach Gruppen geordnet	- 47 -
3.6.2	Gruppenübergreifende Analyse der qPCR-Ergebnisse	- 49 -
4.	Diskussion	- 51 -
4.1	Diskussion der Vorversuchsergebnisse.....	- 51 -
4.1.1	Blockierung des Zellzyklus im allogenen Spenderorgan mittels Retrorsin.....	- 51 -
4.1.2	Induktion und Proliferationsaktivierung hepatischer Vorläuferzellen	- 52 -
4.2	Diskussion der Hauptversuchsergebnisse	- 52 -
4.2.1	Verhalten der isolierten primären Hepatocyten in Mono- und Kokultur	- 52 -
4.2.2	Bewertung der Y-Chromosomendetektion mittels FisH und qPCR	- 54 -
	Literaturverzeichnis	- 59 -

Tabellenverzeichnis	- 66 -
Abbildungsverzeichnis.....	- 67 -
Materialliste.....	- 69 -
Lösungen und Medien.....	- 75 -
Abkürzungsverzeichnis	- 80 -
Eidesstattliche Versicherung	- 83 -
Lebenslauf	- 84 -
Danksagung.....	- 84 -

Zusammenfassung

Die orthotope Lebertransplantation (LTx) gilt als Standardtherapie bei terminaler Leberinsuffizienz. Trotzdem existieren weiterhin gravierende Probleme auf diesem Gebiet. So steht derzeit u.a. die meist lebenslange Immunsuppression mit ihren Folgeerkrankungen im Fokus der Forschung.

Das Ziel des Projektes, dem diese Arbeit angehört, ist es, durch eine kombinierte Leber- und Leberzelltransplantation, ein Spenderorgan zu schaffen, das vom Immunsystem des Organempfängers voll toleriert wird. Hierdurch wären die Probleme einer lebenslangen Immunsuppression gelöst. Um dieses Ziel zu erreichen, sollen erstmals neben einer allogenen Spenderleber auch autologe Hepatocyten sowie autologe hepatische Progenitorzellen (hPc) transplantiert werden. Es wird postuliert, dass die autologen Spenderzellen in der Lage sind, das allogene Spendertransplantat suffizient zu repopularisieren und damit zur Bildung des oben beschriebenen Organs zu führen. Als vorklinische Studie wurde im Rattenmodell die allogene Leber einer weiblichen Dark Agouti Ratte (DA-f) in eine weibliche Lewis-Ratte (Lew-w) transplantiert. Als autologer Spender für die kombinierte Zelltransplantation dienten männliche Lewis-Ratten (Lew-m) des gleichen Inzuchtstamms.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich damit, essentielle Methoden zur Durchführung des Projekts zu etablieren und ihre Ergebnisse zu analysieren und zu vergleichen.

Zur Realisierung des Vorhabens wurde ein Proliferationsvorteil der autologen Spenderzellen gegenüber den Zellen des allogenen Spenderorgans induziert. Um die Proliferation der Hepatocyten im allogenen Spenderorgan zu unterdrücken, wurde den Organspender-Tieren der Mitose-Hemmstoff Retrorsin verabreicht. Mit Hilfe histologischer Methoden konnte gezeigt werden, dass am 45. Tag nach Retrorsin-Gabe die Zellproliferation im Spenderorgan (DA-f) fast völlig zum Erliegen kommt und sich dieser Tag am besten für die Transplantation eignet. Zur Proliferationsinduktion sowie zur Induktion von hPc in der Leber des Leberzellspenders (Lew m) wurden die Tiere durch die Applikation eines 2-Acetylaminofluoren (2AAF)-Pellets sowie eine 6 Tage später folgende partielle Hepatektomie (PH) vorbehandelt. Es konnte hierdurch gezeigt werden, dass am 9. Tag nach PH mit der größtmöglichen Anzahl an hPc und der höchsten Proliferationsrate zu rechnen ist. Es zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen Mono- und Kokultur von adulten Hepatocyten und Vorläuferzellen.

Um die transplantierten Zellen im Spenderorgan nachzuweisen und die Repopularisierung des Organs zu verfolgen, wurden Fluoreszenz in situ Hybridisierung und die quantitative Polymerase-Kettenreaktion zum spezifischen Nachweis von auf den Y-Chromosomen befindlichen DNA-Abschnitten etabliert und hinsichtlich ihrer Validität verglichen. Durch beide Methoden konnte erfolgreich gezeigt werden, dass die postulierte Repopularisierung des allogenen Spenderorgans mit autologen Spenderzellen bis Tag 90 stattfindet. Des Weiteren stellte sich heraus, dass die tatsächliche Repopularisierung und Proliferation erst ab dem 30. Tag nach stattgehabter Leber- und Leberzelltransplantation beginnt. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit konnten wichtige Fragen beantwortet und essentielle Grundlagen zur weiteren Durchführung des Projekts der Bildung eines voll autologisierten Lebertransplantats geschaffen werden.

Summary

Orthotopic liver transplantation (LTx) is the standard therapy for end-stage liver disease. However it is associated with several problems, e.g. life-long immunosuppressive therapy and its consequences, which are major subjects in current research.

The aim of the project, which this work is part of, is to create a donor organ that is completely tolerated by the immune system of the recipient by performing a combined liver- and liver-cell-transplantation. To reach this point an allogeneic donor liver, autologous adult hepatocytes and autologous hepatic progenitor cells (hPc) shall be transplanted together for the first time. It is postulated that the autologous donor cells will sufficiently repopulate the allogeneic donor organ. This will lead to operational tolerance, as described above. In a preclinical rat model the allogeneic liver of a female Dark Agouti rat (DA-f) was transplanted into a female Lewis rat (Lew-f). The autologous cells of a syngeneic male Lewis rat (Lew-m) were used for the combined cell transplantation.

This dissertation describes implementation and establishment of essential methods for the project and analyzing its results. To realize this project a proliferation advantage of the autologous donor cells towards the allogeneic cells of the donor organ was induced. By using Retrorsin, a cell-cycle inhibitor, the proliferation of hepatocytes in the allogeneic donor organ was restrained. Histology showed that there is nearly no cell proliferation left in the donor organ (DA-f) at the 45th day after Retrorsin application. So this is the best day to perform organ transplantation. To induce proliferation and a valuable level of hPc in the liver of the cell donor (Lew-m), the rats received 2-Acetylaminofluorene (2-AAF) pellets and underwent subsequent partial hepatectomy (PH) 6 days after. Results showed that the highest amount of hPc and cell proliferation is found on the 9th day after PH. No severe differences were noted between mono- and co-culture of adult hepatocytes and progenitor cells.

To detect transplanted cells and validate the repopulation of the organ, fluorescence in situ hybridization (FISH) and quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were implemented and compared for specific detection of DNA segments only found on chromosome Y. Both methods proved that the postulated repopulation of an allogeneic donor organ with autologous donor cells occurs up to day 90 after combined organ and cell transplantation. Additionally it was shown that repopulation and proliferation of autologous donor cells starts after the 30th day after combined liver- and liver cell transplantation. With this work severe problems were solved and essential basics for the implementation of a fully autologous liver graft were established.

1. Einleitung

1.1 Die Leber

Die Leber, ein lebenswichtiges Organ, ist sowohl für die Erzeugung als auch die Aufrechterhaltung eines konstanten inneren Milieus für alle extrahepatischen Organe und Gewebe verantwortlich.

Sie erfüllt in diesem Rahmen sehr unterschiedliche Funktionen. Als zentraler Ort in der primären Nährstoffverwertung ist sie das einzige menschliche Organ, das eine wechselnde Quantität und Qualität an Nährstoffe tolerieren kann, diese in der Resorptionsphase speichert und während der Hungerphasen kontrolliert der Peripherie zur Verfügung stellt. Sie gewährleistet somit die komplette Glucose-, Aminosäure-, Ammoniak- und Hydrogencarbonathomöostase. Mittels ihrer Gallensäuresynthese und Gallebildung wird des Weiteren die Resorption von Fetten und lebenswichtigen Vitaminen ermöglicht (1). Durch Ihre Funktion als wichtigstes Organ in der Synthese und Prozessierung der meisten Plasmaproteine, ist die Leber maßgeblich an der Blutgerinnung, der Immunabwehr sowie der Aufrechterhaltung des onkotischen Drucks beteiligt. Ein weiterer Aufgabenbereich der Leber ist die Biotransformation. Hier werden hydrophobe toxische Endo- (körpereigene Stoffe) und Xenobiotika (körperfremde Stoffe) in hydrophile, nicht-toxische Produkte transformiert, um sie danach über Urin oder Faeces ausscheiden zu können. Die Leber fungiert als Blutspeicher und nicht zuletzt kommt ihr eine Rolle bei der Bildung, Speicherung und Prozessierung von Signalmolekülen zu (1).

Hieraus wird klar, warum ein komplettes Versagen der Leberfunktion eine akut lebensbedrohliche Situation darstellt. Eine etablierte Behandlungsmethode bei akutem und chronischem irreversiblen Leberversagen stellt die orthotope Lebertransplantation (LTx) dar.

1.2 Die Entwicklung der Lebertransplantation

1.2.1 Chirurgische und allgemein-klinische Aspekte

Das Chirurgenteam um Thomas E. Starzl führte 1963 an einem 3-jährigen Jungen, der an kongenitaler Gallengangsatresie litt, die weltweit erste LTx am Menschen durch. Obwohl dieser erste Patient bereits intraoperativ an unstillbaren Blutungen verstarb, stellt dies den Beginn der klinischen und chirurgischen Entwicklung der LTx dar (2).

Versuche, eine heterotope Lebertransplantationsmethode zu etablieren, stellten sich als wenig erfolgversprechend heraus. Ein eingeschränktes Operationsfeld, Schwierigkeiten der Anastomosierung von Gallengang und Gefäßen sowie deren leichte Kompression, zählen zu den Hauptproblemen, die letztlich diese Methode bis heute unmöglich machen (3).

In den folgenden Jahren gelang es insbesondere Vorreitern, wie Sir R.Y. Calne in Cambridge/England (3), durch die Einführung weiterer Immunsuppressiva und Optimierung der Operationstechnik, erste Transplantationsprogramme zu gründen. A. Gütgemann führte die erste erfolgreiche LTx in Deutschland durch (4).

Eines der Hauptprobleme der frühen Lebertransplantation war die Galleableitung. Während Rekonstruktionen, wie eine Cholecysto – Jejunostomie zu hohe Komplikationsraten aufwiesen (5-9), konnten diese schließlich durch die von P. Neuhaus eingeführte Seit-zu-Seit-Choledocho-Choledochostomie auf unter 4% gesenkt werden (10). Auch die End-zu-End-Choledocho-Choledochostomie stellt ein etabliertes Verfahren dar. Durch Nutzung eines extrakorporalen veno-venösen Pumpenbypasses und Fortschritte in der Anästhesie konnten schließlich längere anhepatische Phasen toleriert werden (11, 12).

Auch im Bereich der Spenderorgankonservierung wurden große Fortschritte gemacht. Während 1963 durch einfache Perfusion mit gekühlter Glucose-Lösung die Organe nur sehr kurze Ischämiezeiten tolerierten (2), ist es inzwischen möglich, durch Nutzung von speziellen Konservierungslösungen kalte Ischämiezeiten von bis zu 18 Stunden mit Erhalt der Organfunktion zu gewährleisten (13, 14).

Die Teil-Lebertransplantation nach Leichenspende (15, 16) sowie die Leberlebendspende (17, 18) zählen ebenfalls zu wichtigen Meilensteinen der chirurgischen Entwicklung. Durch sie wurde eine Möglichkeit geschaffen, dem Mangel an Spenderorganen zu begegnen. Während die Leberlebendspende mittlerweile einen festen Anteil der Gesamtlebertransplantationen ausmacht und in einigen Zentren etabliert ist (18, 19), kann die Teil-Lebertransplantation aufgrund des hohen personellen und logistischen Aufwands in Deutschland nur an sehr wenigen hochspezialisierten Zentren realisiert werden (20).

Trotz aller chirurgischen Fortschritte sowie weiteren Errungenschaften im perioperativen Bereich (21, 22) und auf anderen Gebieten, wären die Ergebnisse der Lebertransplantation, wie sie heute erreicht werden, niemals ohne die Anwendung moderner Immunsuppressiva möglich.

1.2.2 Aspekte der Immunsuppression

Die schlechten Überlebensraten zu Beginn der Lebertransplantation im Menschen sind zu einem großen Teil dem Fehlen wirkungsvoller Medikamente zur Unterdrückung der Abstoßung des körperfremden (allogenen) Spenderorgans zuzuschreiben. Solche Medikamente werden als Immunsuppressiva bezeichnet.

Zwischen 1963 – 1979 wurden daher lediglich verschiedene Kombinationen von Prednison (ein dem körpereigenen Kortisol struktur- und wirkungsverwandtes Medikament), Azathioprin (ein

Zytostatikum), sowie ein aus verschiedenen Tierrassen gewonnener Antikörper, das sogenannte Anti-Lymphozyten-Globulin zur Immunsuppression verwendet. Die 1-Jahres-Überlebensraten in dieser Zeit betragen zwischen 28,8% und 50% in den verschiedenen Versuchsserien und waren somit nicht zufriedenstellend (23).

Der Durchbruch, der schließlich hohe Langzeitüberlebensraten ermöglichen sollte, fand 1979 statt, als R. Y. Calne als erster Cyclosporin A (CsA) in der klinischen LTx am Menschen einsetzte (24). CsA ist ein Calcineurin-Inhibitor und verhindert als solcher die Freisetzung von Interleukin-2 und anderen Botenstoffen und hemmt hierdurch die Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten. Diese Eigenschaft macht CsA zu einem wirkungsvollen Immunsuppressivum nach Organtransplantation (25).

In Folge des Einsatzes von CsA konnten die 1-Jahres-Überlebensraten sehr schnell auf bis zu 70% gesteigert werden (23), woraufhin die Lebertransplantation schließlich durch das *National Institute of Health* im Jahr 1984 als Standardverfahren zur Therapie bei terminaler Leberinsuffizienz anerkannt wurde (26).

Tacrolimus, ein weiterer Calcineurin-Inhibitor, stellte sich nach seiner Entdeckung (27, 28) als weiteres potentes Mittel zur Unterdrückung akuter Abstoßungen heraus (29, 30) und gehört seit 1994 genau wie Cyclosporin A zur Standardmedikation nach LTx. Es folgte die Entwicklung weiterer Substanzen wie Mycophenolatmofetil (31) und Rapamycin (32, 33), die die Rate an Abstoßungsreaktionen bei geändertem Nebenwirkungsprofil noch weiter senken konnten.

1.3 Aktueller Stand in Klinik und Forschung

Die LTx ist zu einem Standardverfahren geworden. Seit der ersten LTx 1963 wurden allein in Europa über 100.000 Lebern transplantiert (Abb. 1). Davon 5995 im Jahr 2012. Die 5-Jahres-Überlebensraten liegen dabei für die Gesamtheit aller Indikationen für LTx nach dem Jahr 2000 bei ca. 73% (34).

Trotz dieser guten Entwicklung stellen sowohl der Mangel an Spenderorganen als auch die Organabstoßung weiterhin klinische Hauptprobleme dar. Die oft lebenslang notwendige Immunsuppression zum Schutz vor irreversiblen Organabstoßungen führt häufig zu weiteren Folgeerkrankungen bei transplantierten Patienten. Hierzu zählen u. a. die Entwicklung von Neuropathien, Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, arterieller Hypertonie und Malignomen (35). Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen der Immunsuppressiva wird in der Klinik versucht, diese schnellstmöglich auf ein tolerierbares Minimum zu reduzieren. Bei einigen Patienten zeigte sich, dass die immunsuppressive Therapie vollständig abgesetzt werden kann, ohne dabei eine Abstoßung zu provozieren. Dieser Zustand wird als operationale Toleranz bezeichnet (36).

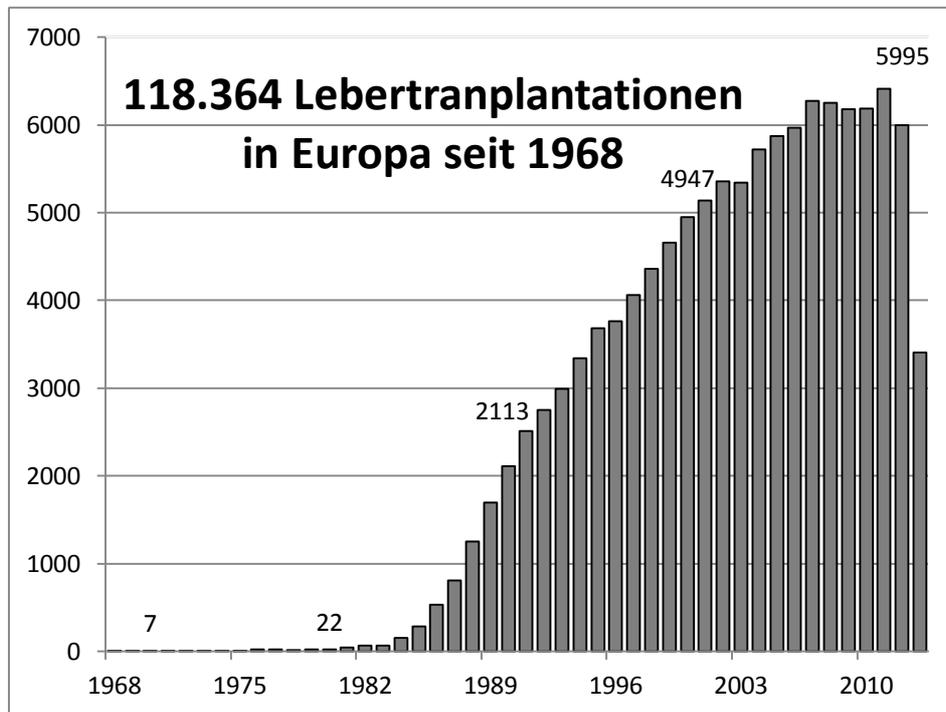


Abb. 1: Entwicklung der Gesamtanzahl an Lebertransplantationen in Europa seit 1968 (nach: European Liver Transplant Register – Homepage; Evolution of LTs in Europe [Stand: 01.12.2014; <http://www.eltr.org/Evolution-of-LTs-in-Europe.html#>])

Die Mechanismen, die zu einer solchen Toleranz führen, sind derzeit nicht vollständig geklärt. Diskutiert werden u.a. die Induktion von Mikrochimärismen durch mit dem Spenderorgan transplantierte Stammzellen, die Produktion löslicher Spender-MHC-Antigene des Lebertransplantats und Masseneffekte der im Lebertransplantat enthaltenen Spenderleukozyten, um nur einige Erklärungsmodelle zu nennen (37, 38). Trotzdem ist die Induktion einer operationalen Toleranz in der Klinik zurzeit nur bei wenigen Patienten möglich. Ein Ausschleichen der Immunsuppression (Weaning) ist mit einem hohen Rejektionsrisiko und einer möglichen chronischen Schädigung des Transplantates verbunden (39). Dies zeigt, dass neue Wege zur Toleranzinduktion erschlossen werden müssen.

1.4 Klinisches Ziel

Die Induktion operationaler Toleranz nach Lebertransplantation steht seit längerer Zeit im Fokus internationaler Forschung. Zur Erlangung dieses Ziels soll eine Ganzorgantransplantation mit einer Leberzelltransplantation kombiniert werden.

Erkrankte Lebern, die während einer Explantation gewonnen wurden, können hierfür als mögliche Leberzellquelle genutzt werden (40). Trotz einer geringeren Gesamtzahl isolierter viabler Zellen aus geschädigten Organen verglichen mit nicht genutzten/abgelehnten gesünderen

Spenderorganen (41), besitzen adulte Hepatocyten (Hc) geschädigter Organe viele wertvolle Eigenschaften.

Hc besitzen eine ausgeprägte metabolische Aktivität und die Fähigkeit zur Proliferation im Fall eines Zell- oder Gewebeverlustes, z.B. nach Hemihepatektomie (42). Diese Fähigkeit adulter Hc ist stärker ausgeprägt als bei fetalem Gewebe oder embryonalen Stammzellen (43).

Es wird außerdem angenommen, dass eine chronische Leberschädigung die Aktivierung und Proliferation somatischer Stammzellen und hepatischer Progenitorzellen (hepatic progenitor cells, hPc) induziert (44). Sogenannte „Ovalzellen“ (oval cells, Oc) sind in diesem Zusammenhang im Nagermodell als bipotente hepatische Vorläuferzellen mit ovalem Zellkern identifiziert worden, die sowohl stammzell- als auch hepatocytenspezifische Oberflächenmarker exprimieren. In Folge verschiedener Grunderkrankungen und Leberschädigungen konnten Oc-ähnliche Zellen sowohl in humanen Lebern, als auch bei verschiedenen Nagetierarten nachgewiesen werden (45, 46).

Wenn die Proliferationseigenschaften adulter Hc inhibiert werden, differenzieren Oc sowohl zu Hepatocyten als auch zu Cholangiozyten, wobei die Anzahl an Oc direkt von der Schwere der Grunderkrankung abhängt (47-49). Zudem konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass eine Zelltransplantation bestehend aus adulten Hc und Vorläuferzellen eine verbesserte Repopularisierung des Empfängerorgans zur Folge hat (50, 51).

Es wird daher postuliert, dass eine kombinierte autologe Zelltransplantation aus adulten, metabolisch aktiven Hepatocyten und hepatischen Vorläuferzellen eine suffiziente Repopularisierung eines allogenen Spenderorgans bewirkt und zu operationaler Toleranz führen kann. Die zu transplantierenden Zellen sollen dafür aus der explantierten geschädigten Leber des Transplantationspatienten isoliert werden. Darüber hinaus soll durch ein ausschleichendes Immunsuppressionsprotokoll in diesem Versuchsaufbau eine operationale Toleranz induziert werden.

Um die Durchführbarkeit von klinischen Studien zu gewährleisten, ist es zwingend nötig Vorversuche im Tiermodell durchzuführen. Sowohl für die Induktion von Vorläuferzellen, wie Oc und deren Isolierung, als auch für die Isolierung von primären adulten Hc aus explantierten Lebern im Rattenmodell sind verschiedene akzeptierte Protokolle in der Fachliteratur zu finden (52-55).

1.5 Grundlage der Versuche im Tiermodell

Werden Transplantate zwischen zwei genetisch identischen Individuen (syngen) eines Inzuchtstammes übertragen, so sind immunologisch bedingte Reaktionen des Spenderorgans

ausgeschlossen. Bei Übertragung von Organen zwischen zwei genetisch disparaten Individuen derselben Spezies (allogen) jedoch kommt es zu immunologischen Reaktionen.

Aus diesem Grund bieten sich allogene Transplantationen zur Analyse solcher Reaktionen, sowie zur Toleranzentwicklung an.

Die allogene Leber einer weiblichen Dark Agouti-Ratte (DA-f) wird daher orthotop in eine weibliche Lewis-Ratte (Lew-f) transplantiert. Anschließend werden isolierte adulte Hc und hepatische Vorläuferzellen aus einer männlichen Lewis-Ratte (Lew-m) über die Milz des Empfängertiers appliziert. Transplantationen zwischen DA-Tieren und Lewis-Ratten stellen aufgrund starker Histoinkompatibilität ein in der Literatur bekanntes akutes Abstoßungsmodell dar (56, 57). Die beiden Lewis-Tiere gehören dem gleichen Inzuchtstamm an und sind somit syngen, wodurch keine Abstoßung zu erwarten ist.

Des Weiteren sollen zur Etablierung des Tiermodells unterschiedliche Vorbehandlungen vorgenommen werden. Hierbei soll durch gezielte Behandlung der DA-f und der Lew-m-Tiere ein Proliferationsvorteil der syngen Spenderzellen (Lew-m) gegenüber den Zellen der allogenen Spenderleber (DA) induziert werden. Während der gesamten Etablierung sollen alle Tiere eine konstante Immunsuppression mit CsA erhalten. Dies ist wichtig, um in der Etablierungsphase akute Abstoßungsreaktionen möglichst zu verhindern.

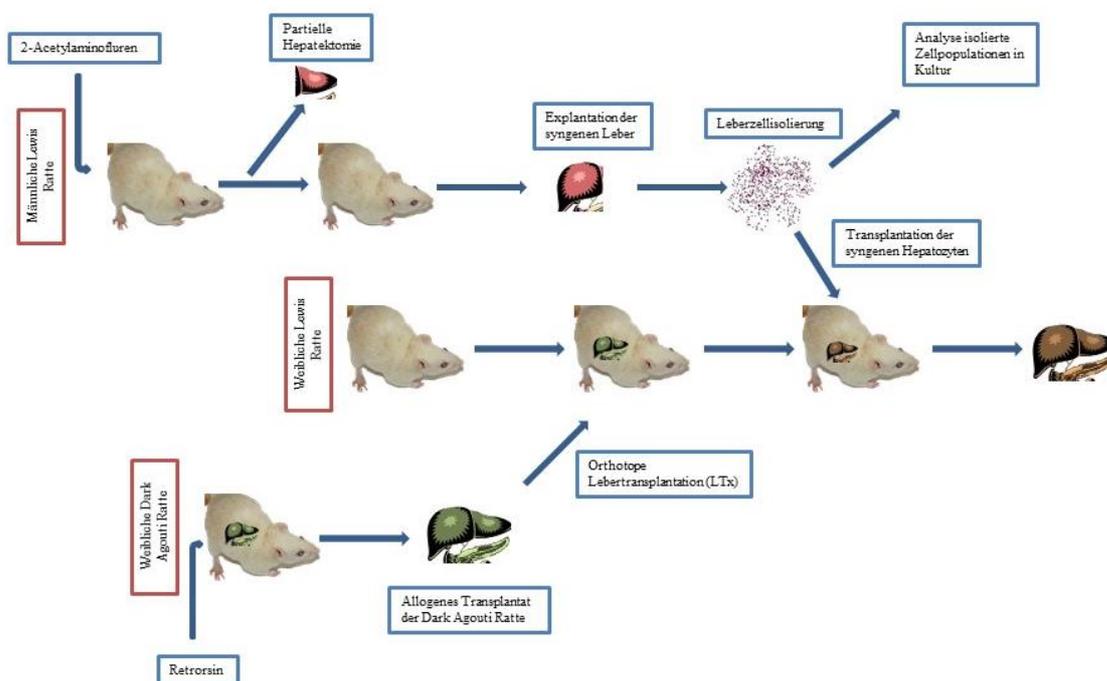


Abb. 2: Grafische Zusammenfassung des Versuchsaufbaus

1.6 Etablierungsarbeiten

1.6.1 Blockierung des Zellzyklus im allogenen Spenderorgan

Retrorsin ist ein Mitglied der Pyrrolizidinalkaloid-Familie. Diese sind dafür bekannt, toxisch auf das Lebergewebe zu wirken (58, 59), z.B. durch die Inhibition der Proliferationsfähigkeit der Hc (60, 61). Durch eine Behandlung der allogenen DA-Tiere mit Retrorsin soll der Zellzyklus der Hc inhibiert werden, um so den Spenderzellen einen Proliferationsvorteil im Spenderorgan zu ermöglichen.

Im Rahmen der Etablierung soll die in der Literatur beschriebene Wirksamkeit einer Retrorsin-Behandlung verifiziert werden, um den Zeitpunkt mit der niedrigsten Mitoserate im Spenderorgan anhand histologischer Färbungen zu ermitteln.

1.6.2 Proliferationsaktivierung hepatischer Vorläuferzellen des Zellspenders

Für die Proliferationsaktivierung der oben genannten Oc sind in der Fachliteratur verschiedene Methoden beschrieben. Allen gemeinsam ist im ersten Schritt die Inhibition des Zellzyklus adulter Hc. Zu den bekannten Methoden hierfür gehören u. a. die Verwendung von Ethionin (55), 2-Acetylaminofluoren (2-AAF) (62), D-Galactosamin (63) oder eine Cholin-arme Diät (54).

Um die Proliferation von hepatischen Vorläufern zu induzieren folgen beispielsweise eine Behandlung mit Carbontetrachlorid (CCL₄) (64), einem Allylkohol (AA) (65), oder eine Leberteilesektion (partielle Hemihepatektomie, PH) (53, 62, 64). Verschiedene Studienergebnisse legen nahe, dass das 2AAF/PH-Modell, im Vergleich zu anderen Methoden, das für diesen Versuchsaufbau vielversprechendste Modell mit der höchsten Ausbeute an Oc ist (53, 64, 65). Während 2AAF von den Hc intrazellulär zu einem toxischen Derivat umgewandelt wird, das den Zellzyklus der Zellen blockiert, sind Oc nach deren Anregung durch die PH weiterhin in der Lage zu proliferieren. Trotz breiter Anwendung dieses Konzeptes in der Literatur (52-54, 64, 66-69), existiert bislang kein Konsens für den Zeitpunkt mit maximaler OC-Detektion nach erfolgter PH. Die Zeitpunkte divergieren hierbei zwischen 7 und 11 Tagen post PH. Die Tabelle 1 fasst eine Übersicht der Literaturergebnisse zusammen.

Tab. 1: Übersicht über Zeitpunkte einer partiellen Hepatektomie (PH) nach erfolgter 2AAF-Implantation und Tage der höchsten Ovalzellen (OC)-Detektion nach PH.

Literaturquelle	PH-Tag post-2AAF (d)	Höchste OC-Detektion post-PH (d)
Petersen et al. (64)	7	9
Shimano et al. (68)	5	7
Sanchez et al. (69)	4	8
Jelnes et al. (54)	5	9
Yovchev et al.(52)	7	10
Shupe et al. (53)	7	9-11
Darwiche et al. (66)	7	11
Batusic et al. (67)	6	7

Neben der Ausbeute an Oc ist es von großer Bedeutung, den Zeitpunkt nach PH mit dem größten Anteil proliferierender Zellen zu bestimmen. Um den geeigneten Zeitpunkt für die eigene Studie zu identifizieren, sollen exemplarisch vorbehandelte Lew-m Tiere an verschiedenen Zeitpunkten nach PH finalisiert und deren Lebern histologisch aufgearbeitet werden.

1.6.3 Etablierung eines Zellisolierungsprotokolls für hepatische Progenitorzellen

Nach histologischer Bestimmung des optimalen Isolierungszeitpunkts, soll ein geeignetes Isolierungsprotokoll für hepatische Vorläuferzellen etabliert werden. Die Grundlage für die Isolierung hepatischer Vorläuferzellen bildet eine abgewandelte Form der sogenannten „2-Step“-Isolierung adulter Hepatocyten nach Neufeld et al. (70). Nach einem Kollagenase-Verdau der Leber erhält man durch Zentrifugation eine parenchymale sowie eine nicht-parenchymale Fraktion. Während die parenchymale Fraktion die adulten Hc enthält, findet man in der nicht-parenchymalen Fraktion unter anderem die gesuchten Vorläuferzellen. Nach Trennung dieser beiden Anteile ist es nötig, die nicht-parenchymale Fraktion aufzureinigen um eine möglichst reine Vorläuferzellsuspension zu erhalten. Die Arbeitsgruppe um Shupe et al. (53) stellten in ihrer Studie verschiedene Isolationsmöglichkeiten für Oc dar. Hierunter befand sich u. a. die Aufreinigung mittels eines Dichtegradienten, die auch in anderen Arbeiten beschrieben wurde (52, 55). Im Rahmen der Etablierungsarbeiten des Tiermodells wurde daher ein Protokoll zur Oc-Isolierung über einen Dichtegradienten genutzt.

1.6.4 Zellkulturversuche in Hepatocyten-Kultur

Ein wichtiger Punkt während der Transplantationsversuche ist die Transplantation möglichst viabler Hepatocyten. Es ist daher wichtig, den Zustand der Zellen anhand verschiedener Parameter nach der Isolierung und deren hypothetische Entwicklung im Zeitverlauf zu ermitteln. Dies soll durch Mono- (Hc) und Kokulturversuche (Hc + Oc) realisiert werden.

1.6.5 Etablierung und Vergleich von Methoden zum Nachweis syngener Spenderzellen in der allogenen Transplantatleber und deren Repopularisierungspotential

Um die transplantierten syngenen Hc und Oc im allogenen Transplantat und damit die Repopularisierung und Autologisierung des Transplantats nachweisen zu können, ist es nötig, valide Detektionsmethoden zu etablieren und diese gegebenenfalls zu kombinieren.

In der Literatur finden sich mehrere Methoden. Neben der Radioisotopen- und Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von Zellen (71, 72) gibt es chemische Marker (z.B. Bisbenzimid, PKH 26) (73), die eine Unterscheidung der Spenderzellen (Lew-m), des Spenderorgans (DA-f) und Empfängergewebe (Lew-f) ermöglichen. Jedoch weisen diese Methoden entscheidende Nachteile auf. Durch hohe Toxizität, eine nicht langzeitstabile Nachweisbarkeit, ihren Einfluss auf Viabilität oder hohe Kontaminationswahrscheinlichkeit sind diese Methoden für den Versuchsaufbau ungeeignet (73, 74).

Die Nutzung GFP-transgener Tiere (75) als Zellspender scheint auf Grund mangelnder klinischer Übertragbarkeit ebenfalls ungeeignet zu sein, könnte aber für präklinische Versuche genutzt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von transplantierten Zellen ist die Detektion des Y-Chromosoms beim männlichen Zellspender (Lew-m) im Unterschied zum weiblichen Organspender (DA-f) und weiblichen Empfängertier (Lew-f). Hierzu werden 2 Methoden herangezogen: die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH) und die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) eines Y-spezifischen Gens.

Ziel ist es, die gewählten Methoden zu etablieren und hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Validität zu vergleichen.

1.7 Zusammenfassende Zielsetzung

1.7.1 Vorversuche zur Literaturvalidierung

- a) Verifizierung der Wirksamkeit von Retrorsin zur Blockierung der Hepatocytenproliferation mittels histologischer Färbungen (s. 1.6.1).
- b) Überprüfung des 2-AAF/PH-Modells zur Induktion hepatischer Vorläuferzellen (Oc) und Identifizierung des optimalen Zeitpunktes zur Zellisolierung anhand histologischer Analysen (s. 1.6.2).

1.7.2 Hauptversuche

- a) Untersuchung der primären Hepatocyten und des Einflusses von hepatischen Vorläuferzellen auf primäre adulte Hepatocyten anhand von Zellkulturversuchen (s. 1.6.4).
- b) Etablierung von FisH und qPCR zur Detektion der Spenderzellen nach Transplantation im Rattenmodell (s. 1.6.5).

2. Methoden

2.1 Tierexperimentelle Eingriffe

2.1.1 Tierhaltung und Schmerzmanagement

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden unter der Nummer G 0417/09 von der zuständigen Behörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) genehmigt. Die Tiere wurden vorschriftsgemäß in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow Klinikum gehalten. Sie erhielten Futter und Wasser ad libitum. Es herrschte eine konstante Raumtemperatur von 22 ± 2 °C, die Luftfeuchtigkeit betrug zwischen 40-70% und ein 12h Tag-Nachtrhythmus wurde eingehalten. Die Unterbringung erfolgte zu 3-5 Tieren/Käfig. Nach größeren operativen Eingriffen (s. 2.1.2, 2.1.6) wurden die Tiere für 24 h in einem Einzelkäfig isoliert gehalten, um postoperativen Stress zu vermeiden und die Beobachtung zu erleichtern. Das peri- und postoperative Schmerzmanagement richtete sich nach der „Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren“ (76) der Gesellschaft für Versuchstierkunde und Society for Laboratory Animal Science (GV-SOLAS). Intraoperativ erfolgte 30 min vor Beendigung der Narkose die Gabe von 4-5 mg/kg KG Carprofen s.c. sowie 100 mg/kg KG Metamizol. Je nach postoperativem Allgemeinzustand des Tieres wurde die Analgetika-Therapie bis zu 5 d fortgeführt.

Nach Beendigung der Versuche wurden alle Tiere vorschriftsgemäß unter einer tiefen Inhalationsnarkose durch Eröffnung der Hauptschlagader euthanasiert und entsorgt.

2.1.2 2-AAF-Applikation und partielle Hepatektomie bei Lew-m Tieren

Im Rahmen der Vorbehandlung der Lew-m erhielten diese ein 2-AAF-Pellet unter Inhalationsnarkose. Das Pellet gibt eine konstante Dosis von 1,7 mg/d des Wirkstoffs 2-AAF in den Kreislauf der Tiere ab. Die Applikation erfolgte in eine kleine subkutan präparierte Hauttasche (ca. 1x1 cm) im Bereich des Schultergelenks der Tiere. Nach Einlage des Pellet, wurde die Tasche mit chirurgischem Nahtmaterial verschlossen.

Sechs Tage nach 2-AAF-Applikation erfolgte die 60%ige partielle Hepatektomie (PH) unter Inhalationsnarkose. Die gewählte Op-Technik entsprach einer variierten Form der von Higgins et al. und Martins et al. beschriebenen Technik (77, 78). Der Situs wurde durch eine Medianlaparotomie vom Nabel bis zum Xyphoid eröffnet, um eine bessere operative Übersicht zu gewährleisten und die Kontrollmöglichkeit potentieller Blutungen aus den Resektionsrändern der Leber zu verbessern. Reseziert wurden der rechte Anteil des Medianlappens, sowie der superiore und inferiore Anteil des rechten lateralen Leberlappens.

Um bakterielle Infektionen zu vermeiden, wurde ein ca. 1cm² resorbierbares Gentamicinpad (1,1-1,43 mg Gentamicin) i.p. eingebracht. Bevor der Situs wieder verschlossen wurde, erfolgte außerdem ein Volumenausgleich in Form von 4-5 ml NaCl 0,9%-Lösung (i.p.).

2.1.3 Leberexplantation von vorbehandelten Lew-m Tieren

Explantationen zur Literaturbestätigung

Es wurde je einem Tier an Tag 7, 9, 11 und 14 nach stattgefundener PH und 2-AAF-Applikation in Inhalationsnarkose die Leber explantiert. Hierzu wurden der Situs entlang der alten Laparotomie-Narbe wieder eröffnet. Die Leber wurde von Verwachsungen freipräpariert, über die kaudale V. Cava entblutet und mit 10mL NaCl 0,9%-Lösung gespült. Alle restlichen Verbindungen zwischen Leber und Situs wurden gelöst und die Leber auf eine mit NaCl 0,9%-Lösung befeuchtete Kompresse gelegt. Durch Einschneiden des Zwerchfells und Inzision der Aorta abdominalis wurden die Tiere euthanasiert.

Die Leber wurde anschließend mit dem Skalpell in mindestens 3 Teile unterteilt und in dafür vorgesehene, beschriftete Histokinetten in 4%-iger Formalin-Lösung bei 4 °C für min. 24 h und max. 48 h fixiert. Es folgten verschiedene Färbemethoden zur Detektion von Oc sowie zur Proliferationsanalyse (s. 2.4).

Explantationen zur Leberzellisolierung

Es fanden insgesamt 11 Leberexplantationen zur Leberzellisolierung im Rahmen dieser Arbeit statt. Hiervon wurden 8 Lew-m Tiere (Lew-m 1-8) als Zellspender für die Zelltransplantationen (s.2.1.6) und 3 Lew-m Tiere (Lew-m A-C) für die Zellkulturanalysen (s. 2.3.1) genutzt. Nach Festlegung des optimalen Isolationszeitpunktes (s. Ergebnisse) erfolgten alle weiteren Explantationen der Leber 9 Tage nach stattgehabter PH in Inhalationsnarkose. Hierzu erfolgte die Wiedereröffnung des Situs entlang der Laparotomienarbe. Um die Übersicht zu verbessern wurde der Darm ausgelagert. Zur Prophylaxe intrahepatischer Blutgerinnsel wurden 1500 I.E. Natriumheparin über die Penisvene appliziert. Die Leber wurde mittels Wattestäbchen nach kranial auf ihre Facies diaphragmatica gekippt, um Sicht auf den Leberhilus zu erhalten. Für die Leberzellisolierung ist es nötig, die Leber vollständig zu entbluten, und dabei das Gefäßbett intakt zu halten. Hierzu wurde die V. porta vom Hilus aus etwa 2,5 cm nach distal verfolgt und freipräpariert. Die Pfortader wurde nun mittels einer mikrochirurgischen Gefäßklemme ca. 1,5-2 cm distal des Hilus verschlossen. Proximal der Klemme wurde die V. portae eingeschnitten, eine Venenverweilkanüle in das Lumen eingebracht und durch 6-0 Seidenfäden fixiert. Über diese Kanüle erfolgte jetzt die zügige Perfusion mit 1 x EGTA Puffer bei 37 °C.

Um die Perfusion der Leber zu beschleunigen und gleichzeitig eine intrahepatische Druckerhöhung zu vermeiden, wurde die V. cava kaudal des Leberhilus eingeschnitten. Die EGTA-Spüllösung dient neben dem Entbluten auch als Ca^{2+} -Komplexbildner, wodurch Zell-Zell-Kontakte im Parenchym gelöst werden. Nach vollständigem Entbluten wurde die Perfusionsgeschwindigkeit herabgesetzt. Alle noch bestehenden Leber-Situs-Verbindungen wurden durchtrennt. Die V. cava wurde kaudal der Leber ligiert, sodass der Ablauf der 1x EGTA-Lösung nur über den kranialen Anteil der V. cava inferior erfolgte. Die Leber wurde entnommen und in einem sterilen Urincup zur Cleanbench überführt, wo die Isolierung der Hepatocyten sowie der nicht-parenchymalen hepatischen Vorläuferzellen stattfand (s.2.2).

2.1.4 Retrorsin-Applikation in weibliche DA Tiere

Es wurde eine Lösung aus Retrorsin mit Aqua dest. im Verhältnis 2:1 angesetzt, steril filtriert und bis zur Verwendung steril bei Raumtemperatur gelagert. Zur Injektion der Retrorsin-Lösung wurden die Tiere durch Isofluran-Inhalationsnarkose kurzzeitig sediert, um unnötigen Stress zu vermeiden. Den Tieren wurden 30 mg/kg KG Retrorsin i.p. injiziert. Nach 14 Tagen wurden erneut 30 mg/kg KG unter identischen Bedingungen appliziert.

2.1.5 Leberexplantation von vorbehandelten DA Tieren

Je ein Tier wurde 0, 39, 45 und 50 Tage nach Retrorsin-Applikation finalisiert und die Leber zur histologischen Aufarbeitung entnommen. Hierzu wurden die Tiere in Inhalationsnarkose gelegt und entlang der Linea alba laparotomiert. Alle weiteren Schritte der Leberentnahme, der anschließenden Finalisierung sowie der Fixierung der Leber zur histologischen Aufarbeitung entsprachen dem in 2.1.3 beschriebenen Ablauf.

2.1.6 Orthotope Lebertransplantation und Leberzelltransplantation bei Lew-f

Es erfolgte eine modifizierte Lebertransplantation nach Lee (79). Um physiologische Durchblutungsbedingungen zu schaffen und häufige Komplikationen wie Gallengangsstenosen und -nekrosen zu vermeiden, erfolgte ein arterieller Wiederanschluss.

Hierbei wurden mit Retrorsin vorbehandelten weiblichen DA-Ratten die Leber explantiert und den weiblichen Lewis-Ratten orthotop implantiert. Nach erfolgtem Wundverschluss wurden die Tiere isoliert unter Rotlichtlampen zur Beobachtung gehalten, bis sich die Leberzelltransplantation anschloss. Zur Schonung der Tiere erfolgte die Leberzelltransplantation erst nach vollständiger Erholung entweder am Tag der LTx, oder am Folgetag.

Zur Leberzelltransplantation wurde eine Kombination primärer adulter Hepatocyten und nicht-parenchymaler hepatischer Vorläuferzellen (kombinierte Leberzelltransplantation, kLZTx)

syngener Lew-m genutzt. Die zu transplantierenden Zellen umfassten 5×10^6 Hc und einen Anteil der Zellen der Vorläuferfraktion, die auch die Oc enthalten. Die benötigte Zellzahl wurde den Gesamtisolaten entnommen. Der Isolationsvorgang wird in folgenden Abschnitten beschrieben (2.2). Nach einem doppelten Waschschrift mit Dulbecco`s PBS und Zentrifugation wurden die Überstände verworfen. Das Vorläufer- und das Hc-Pellet wurden in je 0,5 ml 1x Dulbecco`s PBS resuspendiert und dann gepoolt. Die Suspension wurde auf eine sterile 1 ml Spritze aufgezogen. Die bereits lebertransplantierte Ratte wurde erneut unter Inhalationsnarkose laparotomiert und die Zellen direkt in das Milzparenchym injiziert. Hierzu wurde die Milz leicht exponiert gelagert und am kaudalen Milzpol eine Ligatur mit 7-0 Seidenfaden vorgelegt. Es erfolgte die Injektion der 1 ml Zellsuspension über einen Zeitraum von ca. 3 min in den unteren Milzpol. Der lange Injektionszeitraum sollte ein mögliches Thromboserisiko durch einen „Zellstau“ im Milzparenchym minimieren. Nach Abschluss der Injektion und dem Herausziehen der Kanüle, erfolgte eine Ligatur des Milzpol, um ein Nachbluten zu verhindern. Zum Abschluss der Operation erfolgten Wundverschluss und adäquate Analgesie vor Beendigung der Narkose.

2.1.7 Immunsuppression

Nach erfolgter LTx und Leberzelltransplantation erhielten die Lew-f eine kontinuierliche Immunsuppression mit dem Wirkstoff Cyclosporin A (CsA, Sandimmun®). Die Initialdosis betrug über einen Zeitraum von 8 Tagen 4 mg/kg KG CsA, beginnend am Operationstag. Vom 9. postoperativen Tag bis zur Finalisierung erhielten die Tiere eine reduzierte Erhaltungsdosis von 2 mg/kg KG CsA. Der Wirkstoff wurde subkutan appliziert.

2.1.8 Gruppeneinteilung, Finalisierung und Gewebeprobengewinnung

Um Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der Repopularisierung der Transplantatleber nach kLZTx zu erhalten, wurden die Empfängertiere in 4 Gruppen mit unterschiedlichen Finalisierungszeitpunkten eingeteilt. Insgesamt 7 Tiere verstarben früh-postoperativ und wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen. Die 8-Tage-Gruppe umfasste 4 Tiere mit LTx und kLZTx. Die 15-, 30- und die 90-Tage-Gruppe umfasste je 5 Tiere mit LTx und kLZTx. Jede der 4 Gruppen enthielt außerdem je 1 Kontrolltier. Die Kontrolltiere erhielten statt einer kLZTx eine 1 ml 1x Dulbecco`s PBS-Injektion über die Milz.

Tab. 2: Übersicht über Finalisierungsgruppen nach kombinierter Transplantation (LTx + kLZTx) mit konstanter Immunsuppressionsapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten post-LTx zur Untersuchung der Repopularisierung des allogenen Spenderorgans mit syngenen Zellen.

Finalisierungsgruppen	A	B	C	D
Zeitpunkt der Finalisierung (post-LTx)	8 Tage	15 Tage	30 Tage	90 Tage
Anzahl kombinierter Transplantationen (LTx + kLZTx)	4	5	5	5
Anzahl Kontrolltiere (LTx + PBS)	1	1	1	1

Der weitere Ablauf der Kontrolltier-Operationen verlief wie in 3.1.6 beschrieben. Es ergaben sich hierdurch die in Tabelle 2 zusammengefassten Gruppen.

Die Kontrolltiere werden im Folgenden der jeweiligen Gruppe entsprechend als KA, KB, ... und die kombinierte Leber-Leberzelltransplantierten Tiere als A1, A2,... bezeichnet. Bis zur Finalisierung wurde der Allgemeinzustand der Tiere täglich über Beobachtung des vitalen Zustands bewertet. Beispielhaft wurde ausgewählten Tieren aus jeder Gruppe Blutproben zur Überprüfung der Leber- und Nierenfunktionsparameter entnommen.

Finalisierung und Probenentnahme erfolgten ebenfalls in tiefer Inhalationsnarkose. Alle Gewebeprobe wurden für min. 24 h und max. 48 h in 4%-iger Formalinlösung bei 4 °C fixiert.

2.2 Leberzellisolierung

Die Abb. 3 zeigt den allgemeinen Ablauf der Isolierung primärer adulter Ratten-Hepatocyten, sowie nicht-parenchymaler hepatischer Vorläuferzellen als Fließschema.

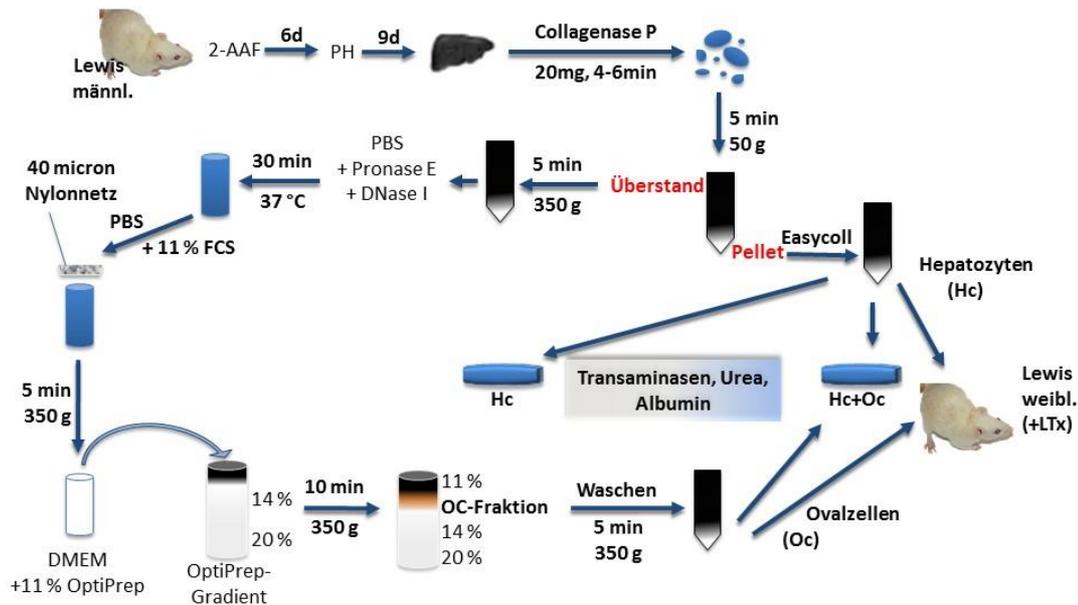


Abb. 3: Schematischer Ablauf der Isolierung primärer adulter Hepatocyten und nicht-parenchymaler hepatischer Vorläufer aus Rattenlebern

2.2.1 Isolierung adulter Hepatocyten

Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank (Clean Bench) statt. Transport der Zellsuspensionen (z.B. Zentrifugation) außerhalb der Clean Bench fand ausschließlich in sterilen verschlossenen konischen Röhren (Falcon®) statt.

Die zur Organperfusion während der Isolierung benötigten Lösungen wurden in sterilen 500 ml Laborflaschen in einem Wasserbad auf 39 °C gehalten und mit einem Gemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid begast. Die Leber wurde frei hängend über einem Siebtrichter platziert. Mit dem in 2.1.3 beschriebenen Venenverweilkatheter wurde sie über eine Heidelberger Verlängerung mit den Lösungen im Wasserbad verbunden. Die Perfusion der Leber mit den Lösungen wurde durch eine Schlauchpumpe gewährleistet.

Nach Perfusion mit 100 ml 1x Leffert's-Puffer schloss sich der enzymatische Gewebeaufschluss an. Hierfür wurde die Leber zwischen 4 und 6 Minuten mit zirkulierender Kollagenase P-Lösung durchströmt.

Durch mechanisches Eindrücken der Leberoberfläche wurde der Endpunkt der Kollagenase-Perfusion bestimmt. Ein optimales Perfusionsergebnis war erreicht, wenn sich bei Nachlassen des Drucks auf die Oberfläche die Leberkapsel vom darunter liegenden Parenchym deutlich abhob. Die Kollagenase-Perfusion wurde umgehend beendet und die Leber schnellstmöglich in eine bereitstehende Petrischale überführt. Hier wurde die restliche Enzymaktivität durch Übergießen mit 4 °C kalter 1x CaCl₂-Lösung gestoppt und das Lebergewebe mit Hilfe eines Skalpell mechanisch zerkleinert. Ab diesem Arbeitsschritt fanden alle weiteren Schritte bei 4 °C statt.

Die so entstandene Zellsuspension wurde über einem Gazetupfer (Porengröße 200 µm) filtriert und auf 50 ml Falcons[®] abgefüllt. Nach anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 50 g hatten sich am Boden der Falcons[®] Zellpellets mit Überstand ausgebildet. Der Überstand enthält die Fraktion der nicht-parenchymale Zellen und damit auch einen Großteil der Vorläuferzellen. Er wurde zur Isolierung der Vorläuferzellen in weitere 50 ml Falcons[®] überführt (s. 2.2.2).

Die Leberzellpellets wurden mit M-DMEM resuspendiert und eine erste Zellzählung und Viabilitätsprüfung durchgeführt. Hierfür wurde eine Zellsuspensionsprobe im Verhältnis 1:10 mit Trypan-Blau-Lösung equilibriert. Die Bestimmung fand mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer statt. Während vitale Zellen unter dem Lichtmikroskop farblos erscheinen, nehmen abgestorbene Zellen auf Grund von Zellmembrandefekten die blaue Farbe der Trypan-Blau-Lösung an. Gezählt wurden 4 Quadranten. Mit Hilfe folgender Formel wurden die endgültigen Zahlen für vitale und tote Zellen ermittelt:

$$\frac{\text{Anzahl der Zellen (vital o.gesamt)}}{4} \times 10^5 = \text{Zellen (vital o.gesamt) in Suspension} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right]$$

Die Zellsuspension wurde mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. Hierfür wurden je 20 ml Easycoll[®]-Lösung mit 5 ml Zellsuspension überschichtet und bei 1474 g für 20 min zentrifugiert. Nach Ende der Zentrifugation wurde der entstandene Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in zwei Waschschritten mit je 30 ml 1x Dulbecco`s PBS überschichtet und anschließend bei 50 g für 5 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden mit 30 ml M-DMEM resuspendiert und erneut gezählt. Bis zur weiteren Verwendung ruhten die Zellen in M-DMEM auf Eis.

2.2.2 Isolierung nicht-parenchymaler hepatischer Vorläuferzellen

Die in 2.2.1 beschriebene Fraktion der nicht-parenchymalen Zellen wurde nach einem modifizierten Protokoll nach Yovchev et al. und He et al. behandelt, um die gewünschten Oc daraus zu isolieren (52, 55). Die Zellsuspension wurde zunächst bei 350 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet enthält die Vorläuferzellen sowie während des Kollagenaseverdau entstandenen Zelldetritus/-debris. Um diesen Debris zu beseitigen, wurde das Pellet in 10 ml Enzymlösung resuspendiert. Die Lösung enthielt 10 mg Pronase und 2 mg DNase I zur Zersetzung der freien Zellbestandteile in der Suspension. Das Zell-Enzym-Gemisch wurde für 30 min bei 37 °C im Temperaturoptimum der Enzyme inkubiert.

Um die Enzymaktivität zu stoppen erfolgte der Zusatz von 1,24 ml fetalem Kälberserum. Anschließend wurde die Suspension über ein Zellsieb (40 µm Porengröße) filtriert, mit 1x Dulbecco`s PBS auf 30 ml aufgefüllt und für 5 min bei 350 g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstand schlossen sich 2 weitere Waschschrte mit 1x Dulbecco`s PBS an. Hiernach wurde das entstandene Zellpellet in 2,5 ml M-DMEM resuspendiert.

Eine Dichtegradientenzentrifugation diente zur weiteren Aufreinigung. Der verwendete Gradient setzte sich aus mehreren übereinandergeschichteten Konzentrationen zusammen, wodurch sich ein Gradientengefälle ergab. Die Grundlage für alle Gradienten-Verdünnungen bildete Optiprep[®] Density Gradient Medium (60%ig). Die 2,5 ml Zellsuspension wurden mit 1,5 ml 30%iger Optiprep[®]-Lösung equilibriert, wodurch 4 ml einer 11%igen Optiprep[®]-Zellsuspension entstanden. In einem 50mL Falcon[®] wurden die 4 ml 11%ige Suspension über 15 ml 14%ige Optiprep[®]-Lösung über 15 ml 20%ige Optiprep-Lösung geschichtet, sodass ein 3-schichtiger Gradient vorlag. Der Gradient wurde bei 350 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete sich zwischen der 11%igen Suspension und der 14%igen Optiprep[®]-Lösung eine Bande, die die gesuchten Vorläufer enthielt (s. Abb. 4).

Die Zellbande wurde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Falcon[®] überführt. Es schloss sich ein doppelter Waschschrte mit je 30 ml 1x Dulbecco`s PBS und 5 min Zentrifugation bei 350 g und 4 °C an. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in M-DMEM resuspendiert.

Es ist nicht auszuschließen, dass sich neben den Oc noch weitere Zellarten (Erythrozyten, Stern-Zellen, andere Hepatocytenvorläufer, ...) in der Fraktion befanden. Eine Identifikation der gesuchten Oc mittels Neubauer-Zählkammer und Lichtmikroskopie innerhalb der Vorläufer-Fraktion war jedoch nicht möglich, da rein optisch kaum Unterschiede in der Morphologie der Zellen zu erkennen waren. Es wurde aus diesem Grund keine exakte Zellzählung durchgeführt.

Bis zur weiteren Verwendung ruhten die Zellen auf Eis.

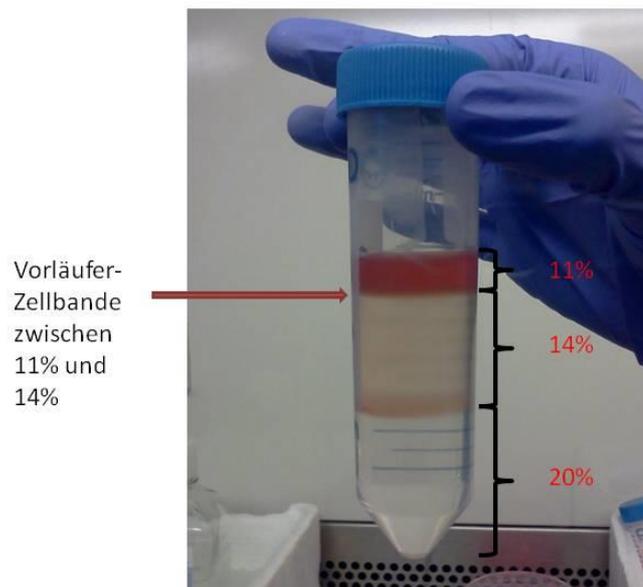


Abb. 4: Darstellung des Optiprep[®]-Dichtegradienten nach der Zentrifugation mit ausgebildeter Zellbande

2.3 Zellkulturversuche und Laboranalysen

2.3.1 Hepatocyten-Kultur und Hepatocyten-Vorläuferzellen-Kokultur

Zur Überprüfung des Verhaltens und der Entwicklung der Hepatocyten von vorbehandelten Lew-m Tieren in Monokultur sowie in Kokultur mit hepatischen Vorläuferzellen desselben Individuums wurden Zellkulturen angelegt. Hierfür wurde von 3 vorbehandelten männlichen Lewis-Tieren (Lew-m A-C) eine Hepatocytenisolierung vorgenommen. Es wurden 6 Zellkulturen je Isolat angelegt. Hierbei handelte es sich um jeweils drei primäre Hepatocyten-Monokulturen (pHc-Kultur) und drei primäre Hepatocyten-Vorläuferzellen-Kokulturen (pHcOc-Kultur).

Die Kulturschalen wurden einen Tag vor Zellaussaat mit 3 ml Kollagen-Lösung beschichtet und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Absaugen der Kollagen-Lösung blieb eine Kollagenbeschichtung am Boden der Kulturgefäße zurück, die den Zellen optimale Voraussetzungen zur Adhäsion bot. Auf jeder Zellkulturschale (100x20 mm) wurden 5×10^6 Hepatocyten ausgesät.

Zusätzlich wurden auf den drei Kokulturen jeweils $\frac{1}{4}$ der Zellen der Vorläuferfraktion ausgesät. Die Kulturen wurden mit M-DMEM auf ein Volumen von insgesamt 10 ml Nährmedium

aufgefüllt. Die Bedingungen waren für alle Kulturen identisch. Die Aufbewahrung fand in einem dafür vorgesehenen Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ bis zum 4. Tag nach der Isolierung statt, danach wurden alle Kulturen verworfen. Mittels Lichtmikroskop wurden alle 24 h Kontrollen auf mögliche Kontamination sowie eine Dokumentation der Morphologie durchgeführt und die Zellen gewaschen. Hierfür wurde das alte Medium unter der Clean Bench abgesaugt und die Kulturen zweimalig mit sterilem 1x Dulbecco`s PBS gewaschen. Danach wurde den Kulturen je 10 ml frisches M-DMEM zugegeben. Die Temperatur von Medium und PBS lag hierfür bei 37 °C, um möglichen Zellstress weitestgehend zu vermeiden.

2.3.2 Laboranalysen der Mediumproben

Ab dem 2. Kulturtag wurden täglich je 2 ml Mediumproben entnommen. Diese wurden umgehend für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, um mögliche Restbestandteile von Zellen abzuschneiden. Dem Überstand wurde 1 ml Medium entnommen und in einem Probenröhrchen an das hauseigene Zentrallabor der Charité, Campus Virchow Klinikum zur Analyse gesendet. Außerdem wurde 1 ml frisches, nicht zur Kultur genutztes M-DMEM an das Labor zur Analyse gesendet, um einen Vergleichswert zu erhalten. Zur Bestimmung des Kulturzustands und der Zellvitalität/viabilität wurden folgende Werte im Medium bestimmt:

- Harnstoff (Urea) in mg/dL
- Aspartat-Aminotransferase (AST) bei 37°C in U/L
- Alanin-Aminotransferase (ALT) bei 37°C in U/L
- Lactat Dehydrogenase (LDH) bei 37°C in U/L

2.4 Histologische Methoden und Immunhistochemie

2.4.1 Paraffin-Schnittmethode

Die Grundlage aller folgenden histologischen Methoden bildet die Herstellung von Paraffinschnitten. Hierzu wurden die in Formalin fixierten Gewebe zunächst gewaschen und anschließend in einer Reihe von Alkohollösungen mit aufsteigendem Volumen-%-Anteil (50%, 70%, 80%, 96%, 99,8%) für jeweils 2 h auf einem Schüttler entwässert. Anschließend wurden die Proben 3 h in Xylol geschüttelt und dann für weitere 3 h in Paraffin bei 60 °C überführt und getrocknet.

Es folgte die Anfertigung von Paraffin-Gewebeblöcken. Von den entstandenen Blöcken konnten nun mittels eines Rotationsmikrotoms 2 µm dicke Schnitte gefertigt und bei 60 °C auf Objektträgern(OT) hitzefixiert werden. Zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte je nach Färbemethode nach unterschiedlichen Protokollen entparaffiniert.

2.4.2 Hämatoxylin-Eosin(HE)-Übersichtsfärbungen

Als Übersichtsfärbung wurde die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung gewählt. Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte zunächst zweimal 1 min in Xylol gestellt, um dann nacheinander in Küvetten mit Alkohollösungen mit absteigender Konzentration (96%, 80%, 70%, 50%) für je zweimal 1 min sowie für 3 min in Aqua dest. geschwenkt zu werden.

Die Gewebeschnitte wurden dann für 10 min in „Hämatoxylin nach Mayer“ getaucht. Durch Schwenken unter Leitungswasser erfolgte das „Bläuen“ der Zellkerne. Nachdem die Schnitte für weitere 30 sec in Eosin getaucht wurden und nochmals unter Leitungswasser geschwenkt wurden, erfolgte das Einstellen der Schnitte in Alkohollösungen (1 min in 96%, 2 x 1 min in 100%, 2 x 1 min in Xylol). Abschließend wurden die Schnitte eingedeckelt und luftgetrocknet.

2.4.3 Proliferationsnachweis innerhalb der Zellspenderorgane durch Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen (PCNA)-Markierung

PCNA-Färbungen wurden in dieser Arbeit zur Beurteilung des Proliferationsverhaltens genutzt. Es wurden daher Färbungen explantierter DA-Lebern nach verschiedenen Retrorsin-Applikationszeiten (s. 1.6.1, 2.1.5) und Lew-m-Lebern an verschiedenen Zeitpunkten nach PH (s. 1.6.2, 2.1.2) durchgeführt.

Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte zweimal (10 min und 5 min) in Xylol, sowie für je zweimal 5 min in Alkohollösungen mit absteigender Konzentration (100%, 96%, 70%) und für 5 min in Aqua dest. eingestellt und geschwenkt. Die weitere Vorbehandlung der Schnitte bestand in einer hitzebasierten Demaskierung in EDTA-Lösung (5 min im Dampfkochtopf), einem Peroxidase-Block (10 min) sowie einem Proteinblock (20 min). Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper in einer 1:400 Verdünnung über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend mit TRIS Buffered Saline (TBS) gewaschen. Es erfolgte die Färbung mittels Labelled (Strept-) Avidin-Biotin-Methode (LSAB) und Nutzung des Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Diese LSAB-Färbemethode beruht auf einer sehr hohen Affinität von Avidin (Hühnereiweiß) oder Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für Biotin.

Hierbei wird ein beliebiger unkonjugierter Primärantikörper mit einem biotinylierten Sekundärantikörper sowie einem Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex kombiniert und mittels eines Chromogens (hier DAB) sichtbar gemacht. Nach HE-Gegenfärbung wurden die Gewebeschnitte eingedeckelt und luftgetrocknet. Die Zellkerne erschienen bei der Auswertung blau, während sich die PCNA-markierten Bereiche durch DAB braun darstellten.

2.4.4 Nachweis hepatischer Vorläuferzellen innerhalb der Zellspenderorgane durch OV-6 Markierung

In der Literatur wird das Antigen OV-6 als ein Oc-Marker beschrieben (53, 66, 69). OV-6-Färbungen wurden daher zur Beurteilung der Vorläuferzell-Induktion durchgeführt. Hierfür wurden explantierte Lew-m-Lebern an verschiedenen Zeitpunkten nach PH (s. 1.6.2, 2.1.2) nach folgendem Protokoll gefärbt.

Die Färbung erfolgte ebenfalls mittels der LSAB-Färbemethode (s.o.). Nach der Entparaffinierung, Rehydrierung und enzymbasierten Proteinase-K-Demaskierung folgten ein 10 minütiger Peroxidaseblock und ein 20-minütiger Proteinblock. Hiernach wurde der OV-6-Primärantikörper mit einer Verdünnung von 1:30 aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift mit TBS-Puffer wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für 30 min inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschschrift mittels TBS-Puffer, das Auftragen der im Kit enthaltenen Streptavidin-Peroxidase für 30 min, sowie die Dako-AEC Substratfärbung für 10 min. Abschließend wurden die Gewebeschnitte mit Hämatoxylin nach Mayer gegengefärbt (10 min), gebläut und konserviert. Alle OV-6 gefärbten Areale stellten sich hiernach rot dar.

2.4.5 Y-Chromosomendetektion mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Anwendung von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung innerhalb der Arbeit

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH) dient zum Nachweis der Repopularisierung transplantierte, männlicher Zellen (Lew-m) im Parenchym der weiblichen Empfängerleber (DA). Hierbei werden die Y-Chromosomen in den Zellkernen der männlichen Zellen mittels einer Nukleinsäure-Sonde über komplementäre Basenpaare markiert und somit in Feinmikroskopischen Gewebeschnitten sichtbar gemacht.

Zur Funktionsüberprüfung der Methode wurde Kontrollschnitte mitgeführt. Neben den Leberschnitten der transplantierten Tiere der Gruppen A-D wurden sowohl Leberschnitte einer männlichen Ratte (Positivkontrolle), als auch Schnitte einer weiblichen Ratte (Negativkontrolle) hybridisiert. Sämtliche Schnitte wurden identisch behandelt.

Ablauf der FisH

Die Entparaffinisierung der Schnitte erfolgte zunächst durch Verflüssigen des Paraffins bei 65 °C, sowie dreimaliger Inkubation der OT für je 10 min in einem frischen Xylobad. Durch Überführen der Schnitte in Alkoholbäder absteigender Konzentration (99,8%, 90%, 70%) für je 3 min und einer Spülung mit Aqua dest. wurden die Proben rehydriert.

Hiernach wurden die OT für 35 min bei 80 °C in Citratpuffer inkubiert, um während der Fixierung der Organe entstandene Quervernetzungen zwischen Aminosäuren und dem Formalin zu lösen. Nachdem die OT abgekühlt waren, wurden sie zweimalig in 2x SSC (sodium citrate standard)-Puffer auf einem Schüttler gewaschen und mit Aqua dest. gespült.

Es folgte ein Pepsinverdau bei dem die Gewebeschnitte für 20 min unter gelegentlichem Schütteln in einer Pepsin-Lösung inkubiert wurden. Nach weiteren zwei Waschschritten in 2x SSC wurden die Proben für 10min in 0,05%-iger Formalin-Lösung getaucht und danach nochmals mit Aqua dest. und 2x SSC gewaschen. Es schloss sich nun eine Inkubation der Gewebeschnitte in Alkohollösungen mit ansteigendem Volumen-%-Anteil (70%, 90%, 99,8%) für jeweils 3 min an.

Für die Hybridisierung wurden auf die luftgetrockneten Gewebe jeweils 10 µl Sondenlösung (3 µl Sonden in 7 µl Hybridisierungspuffer) blasenfrei pipettiert. Das aufgelegte Deckelglas wurde mit Fixogum-Kleber versiegelt und die DNA nach Trocknung bei 80 °C für 15 min denaturiert. In einer feuchten Kammer bei 37 °C erfolgte über Nacht die DNA-Hybridisierung mit den Sonden. Nach Entfernung des Fixogum-Klebers und des Deckgläschen wurden die OTs nacheinander in Waschlösung I bei 73 °C und Waschlösung II (Zusammensetzung der Waschlösungen s. Anhang) bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgten erneut eine aufsteigende Alkoholreihe (s. oben) sowie das Spülen der OTs mit Aqua dest. Hiernach wurden die luftgetrockneten Gewebeschnitte mit einem Tropfen (ca. 10 µl) einer gebrauchsfertigen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung gegengefärbt. DAPI interkaliert in Adenin- und Thymin-reiche Regionen der DNA, wodurch Zellkerne blau erscheinen.

Ablauf der software-gestützten Auswertung der Schnitte

Zur Auswertung der Schnitte wurden mit Hilfe der Software einer Mikroskop-Kamera (QImaging QICAM FAT 1394) für jeden Kanal Schwarz-weiß-Fotos angefertigt. Hierfür wurde das an die Sonden gekoppelte Fluorochrom IDYETM556 mittels des Fluoreszenzmikroskops bei 548 nm (Emissionsmaximum bei 573 nm) angeregt. Die Anregung DAPI-gefärbter Zellkerne fand hingegen bei 358 nm (Emissionsmaximum bei 461 nm) statt. Um farbige Bilder zu erhalten, wurden jeweils die Fotos der DAPI-Anregung mit dem dazugehörigen Foto der Sonden-Signale mittels Software (Image-Pro Plus 5.1) in farbige Fotos konvertiert und übereinandergelegt.

Probenauswahl

Von jedem Tier der Gruppen A-D wurden von mindestens 3 verschiedenen Leberlappen je 2 Schnitte ausgewertet. Von jedem Schnitt wurden bei 100-facher Vergrößerung 6 Bildareale

fotografiert. Es wurden die Anzahl Y-Chromosomen-positiver Kerne sowie die Gesamtanzahl der Kerne in jedem Areal ausgezählt. In Abb. 5 ist der Ablauf vereinfacht dargestellt.

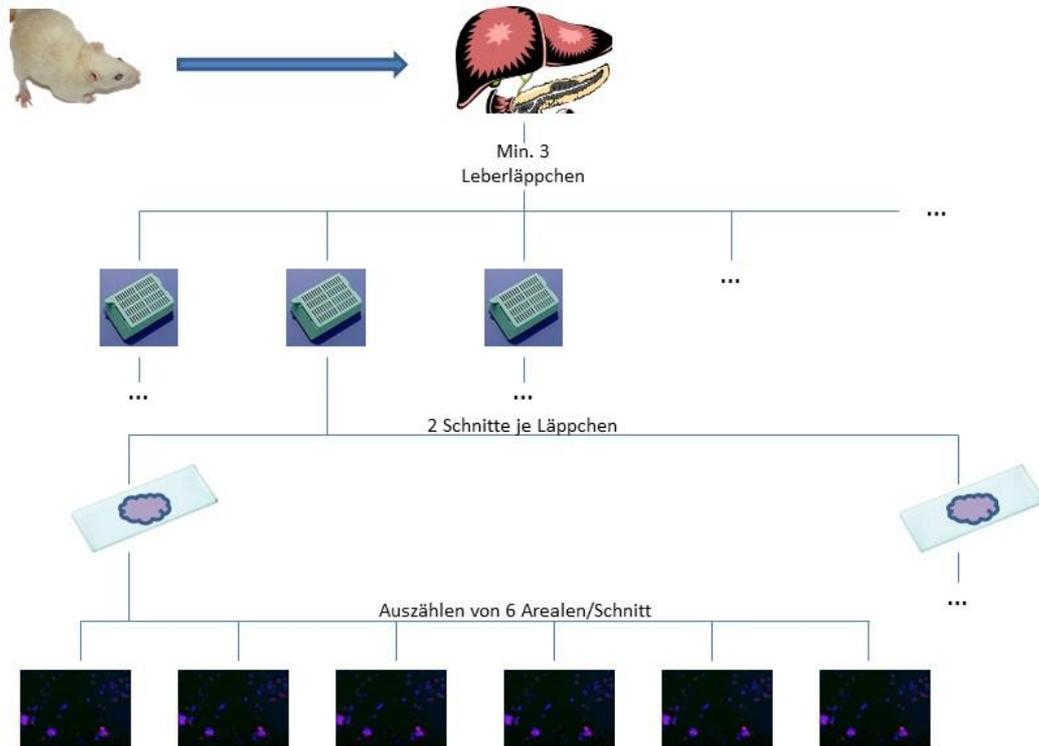


Abb. 5: Schematische Darstellung der FisH-Probenauswertung

2.5 Y-Chromosomendetektion mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Anwendung der Methode

Als zusätzliche Methode zur Kontrolle der Repopularisierung des Lebertransplantates mit männlichen Spenderzellen (Lew-m) und zur Ergebniskorrelation mit FisH wurde die Quantifizierung eines auf dem Y-Chromosom kodierten Gens mittels qPCR ausgewählt. Hierzu wurden zunächst pro Tier (alle Tiere der Gruppen A-D) Paraffinschnitte von jedem eingebetteten Leberlappen angefertigt. Die genomische DNA (gDNA) der einzelnen Lappen wurde 2-fach (Isolation 1, Isolation 2) separat aus den jeweiligen Schnitten isoliert. Je gDNA-Isolation wurden anschließend 2 Pools (Pool A, Pool B) aus der gDNA der einzelnen Lappen erstellt, um so eine Aussage über die Repopularisierung in Bezug auf das gesamte Lebergewebe der Tiere zu bekommen. Insgesamt ergaben sich so pro Tier pro gDNA-Isolation 4 qPCR-Läufe zur Bestimmung des gesuchten Gens. Jeder Pool durchlief hierbei zwei Läufe mittels qPCR. Abb. 6 stellt den Ablauf des Protokolls schematisch für eine einmalige gDNA Isolierung dar.

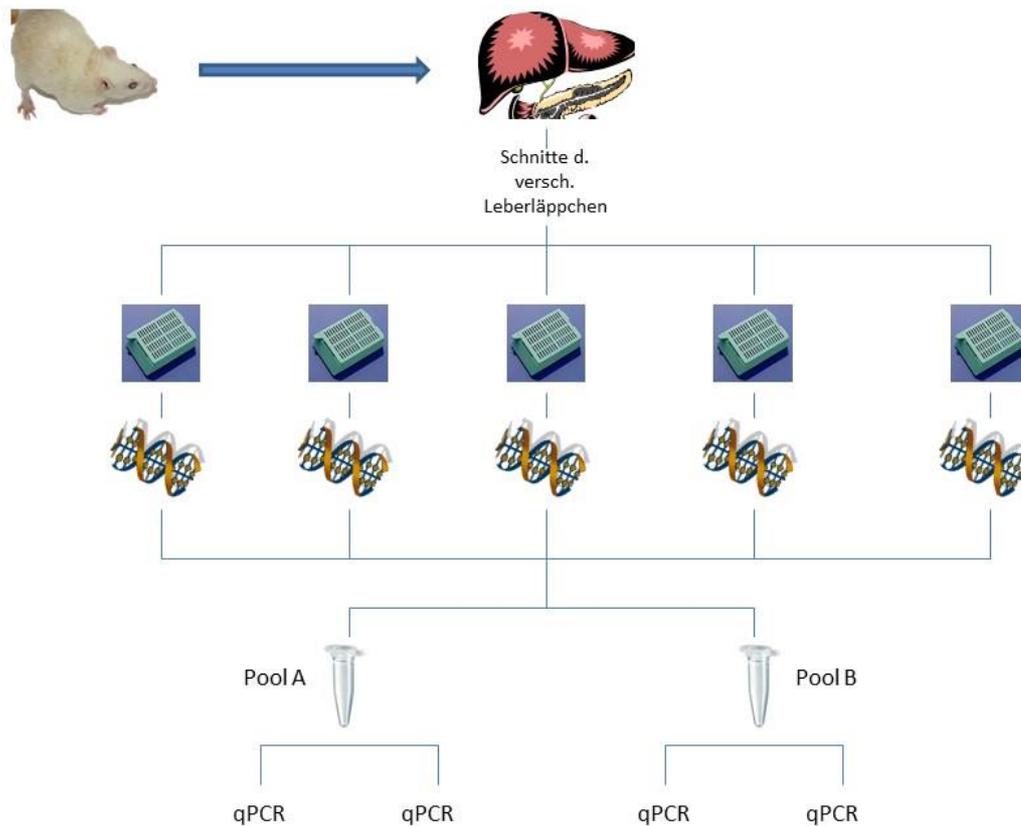


Abb. 6: Schematische Darstellung der y-Chromosomendetektion mittels qPCR für einen einfachen gDNA-Isolationsansatz

2.5.1 Isolation genomischer DNA aus formalin-fixiertem, paraffinisierem Lebergewebe

Von den zu bestimmenden Paraffingewebeblöcken wurden mittels Rotationsmikrotom zwischen 5 und 10 Schnitte à 5 µm angefertigt und in ein RNase/DNase-freies 1,5 ml Reaktionsgefäß (RG) überführt. Die RGs wurden zur Entparaffinisierung der Schnitte mit 1 ml Xylol befüllt, gevortext und anschließend bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert. Der Xylol-Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 1 ml 99,8% Ethanol gewaschen, gevortext und bei 14.000 rpm und Raumtemperatur für 2 min zentrifugiert. Die Ethanol-Überstände wurden wiederum verworfen und das Pellet bei 37 °C luftgetrocknet.

Der weitere DNA-Isolationsablauf mittels eines gebrauchsfertigen Kits der Firma *QIAGEN* (*QIAamp[®] DNA FFPE Tissue Kit*) folgte den Anweisungen des Herstellers. Alle im Folgenden erwähnten Puffer- und Enzymlösungen waren Bestandteile des Kits.

Hierzu wurden die Pellets mit je 180 µl *ATL-Puffer* und je 20 µl Proteinase K resuspendiert, gevortext und bis das Pellet lysiert war (min 1 h) bei 56 °C auf einem Heizblock inkubiert.

Anschließend wurden die RGs für eine weitere Stunde bei 90 °C auf einem Heizblock inkubiert. Es wurden je 200 µl *AL-Puffer* sowie je 200 µl 99,8%iges Ethanol zugesetzt und die Suspension gevortext. Das Eluat wurde nun auf sogenannte *MinElute* Säulen pipettiert. Die Säulen bestanden aus einem Filter sowie einem auswechselbaren Auffangbehälter (AB) mit einem Volumen von 2 ml. Die *MinElute* Säule wurden nun bei 8.000 rpm und Raumtemperatur für 1 min zentrifugiert. Das AB wurde mit samt dem darin befindlichen Eluat verworfen und ausgewechselt. Die sich auf dem Filter befindliche DNA wurde nun zweimal mit je 500 µl *AWI-Puffer* gewaschen, die Säule bei 8.000 rpm für 1 min zentrifugiert und das AB samt filtriertem Eluat verworfen und durch ein neues AB ersetzt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm für 1min um den restlichen Wasch-Puffer abzutrennen. Die Säule wurde anschließend in ein 1,5 ml RG überführt. Es wurden 20-50 µl *ATE-Puffer* auf die Säulenmitte pipettiert und die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer letzten Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min befand sich die isolierte genomische DNA im 1,5 ml RG und stand zur weiteren Prozessierung zur Verfügung. Sie wurde bis zur weiteren Verwendung bei 2-8 °C (<24 h bis Verwendung) bzw. -20 °C (>24 h bis Verwendung) aufbewahrt.

2.5.2 DNA-Konzentrations-Bestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde mit einem Spektrofotometer (*NanoDrop ND 1000*) durchgeführt. Hierfür wurde jeweils 1 µl der isolierten und in *ATE-Puffer* gelösten Rattenleber-DNA durch das Fotometer und die dazugehörige Software analysiert. Die Messung fand im Absorptionsmaximum von DNA bei 260 nm statt.

2.5.3 Y-Chromosomen-Quantitätsbestimmung durch SRY-qPCR

Der SRY-Lokus stellt ein evolutionär stark konserviertes Gen auf Y-Chromosomen von Säugetieren dar (80). Als solches ist es prädestiniert für den Nachweis männlicher DNA in der Leber eines weiblichen Tieres (DA) mittels qPCR.

Die qPCR-Ansätze wurden in 96-Lochplatten pipettiert. Für jeden Ansatz wurden zunächst 5 µl *TaqMan® Gene Expression Master Mix*, 0,5 µl *TaqMan® Gene Expression Assay for "SRY"* (SRY-Primer), sowie 1,5 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser vorgelegt, bevor die gDNA (in 3 µl DEPC-Wasser) zugesetzt wurde. DEPC dient hierbei zur Inaktivierung von möglicherweise vorhandenen Enzymen im Wasser (z.B. RNasen). Das Gesamtvolumen pro Loch betrug demnach 10 µl.

Zur Erstellung einer Standardgerade diente die isolierte gDNA der Leber eines unbehandelten männlichen Lewis-Tieres. Es wurden unterschiedliche Mengen gDNA der männlichen Lewis hinzugefügt. Aus den sich ergebenden CT (Cycle Threshold, Schwellenwert-Zyklus)-Werten für SRY-gDNA bei unterschiedlichen gDNA Mengen wurde die Standardgerade gebildet ($ng=(Ct-b)/m$), auf die sich alle Probenwerte bezogen. Gleichzeitig stand der sich ergebende Wert für den SRY-gDNA-Anteil bei einer bestimmten eingesetzten Menge an gDNA für 100% männlicher Zellen im Gesamtorgan, da es sich hierbei um ein rein männliches Lewis-Tier handelte. Da die codierte SRY-gDNA in jeder Zelle eines männlichen Individuums identisch groß ist, konnte so über die SRY-gDNA-Mengen der Proben in Verbindung mit den Standardwerten indirekt auf den Anteil männlicher Zellen in den Transplantationsorganen geschlossen werden.

Für die Probenansätze wurden jeweils 500 ng gDNA des jeweiligen Pools der Proben eingesetzt und der SRY Anteil bestimmt. Sowohl für die Einzelwerte der Standardreihe als auch für die zu untersuchenden Einzelproben fand eine Dreifachbestimmung pro PCR statt.

Die qPCR wurde nun mit dem *StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems)* durchgeführt. Hierbei wurde die entstehende Fluoreszenz während der exponentiellen Phase der qPCR gemessen. Als Fluoreszenzfarbstoff diente hierfür 6-FAM-phosphoramidit (FAM).

Alle SRY-Primer waren FAM-markiert. Bei Einbau und Elongation eines Primer-Moleküls wurde das daran gebunden FAM freigesetzt und begann zu fluoreszieren. Der Anstieg der Fluoreszenzstärke war damit direkt proportional zu der zur DNA-Synthese bereits genutzten Primer-Molekül-Menge.

Die ermittelten 4 Rohwerte für jedes Tier bestehend aus Isolation1-Pool A1+2, Isolation 1-Pool B1+2, Isolation 2-Pool A1+2 und Isolation 2-Pool B1+2 wurden gemittelt (Mittelwert SRY-positiver Kerne(%)) und anhand der ermittelten Standard-Werte auf eine Gesamtmenge von 100% bezogen. Es wurden Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) vom Mittelwert berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Orthotope Lebertransplantation und Leberzelltransplantation

Die LTx und die kLZTx wurde bei allen den Gruppen A-D zugeordneten Tieren erfolgreich durchgeführt. Die anhepatischen Phasen waren ausgesprochen kurz und lagen zwischen 12,5 min und 20 min (Mittelwert [MW] = 15 min). Die kLZTx wurde erst nach vollständiger Erholung der Tiere entweder am Tag der LTx, oder am Folgetag durchgeführt. Die Tabelle 3 fasst die Transplantationsergebnisse zusammen.

Tab. 3: Anhepatische Phasen während der LTx sowie Zeitpunkte der kLZTx

Gruppe	Tier	Anhep. Phase LTx(in min)	Zeitpunkt d. kLZTx
A	KA	12,5	-
	A1	14,5	1d post Op
	A2	16,5	1d post Op
	A3	15	Op-Tag
	A4	20	Op-Tag
B	KB	14	-
	B1	16	Op-Tag
	B2	12,5	Op-Tag
	B3	15	Op-Tag
	B4	15	Op-Tag
	B5	15	Op-Tag
C	KC	17,5	-
	C1	15,5	Op-Tag
	C2	15,5	Op-Tag
	C3	12,5	1d post Op
	C4	14,5	Op-Tag
	C5	13,5	Op-Tag
D	KD	17,5	-
	D1	15	Op-Tag
	D2	13,5	Op-Tag
	D3	15	Op-Tag
	D4	14	1d post Op
	D5	13,5	1d post Op
	Mittelwert	14,93	

3.2 Leberzellisolierung von Lew m

Die isolierten Hc der Lew-m zeigten nach der Dichtegradienten-Zentrifugation mit 25%iger Easycoll®-Lösung Viabilitäten zwischen 63,8% und 79,9% (MW = 72,3%) bei einer totalen Zellausbeute zwischen 11×10^6 und $74,6 \times 10^6$ (MW = $45,7 \times 10^6$) vitalen Zellen. Es wurden

insgesamt 8 Lew-m als Zellspender für die kLZTx genutzt (s. Tab.4). In der Vorläuferfraktion lag die Viabilität (Trypan-Blau-Färbung) aller Zellen, ohne Berücksichtigung der verschiedenen Zellarten, in jeder Isolierung bei 100%. Wie bereits im Methodenteil (s. 2.2.2) beschrieben, wurde auf eine Zellzählung verzichtet. Daher ergab sich zu diesem Zeitpunkt lediglich die Möglichkeit zur Transplantation eines prozentualen Anteils der isolierten Vorläuferfraktion. In der Regel wurden 25% der Vorläuferfraktion für eine kLZTx genutzt. Bei Lew-m 4 war das Zellpellet der Vorläuferfraktion deutlich kleiner, so dass hier 50% pro kLZTx genutzt wurden. Bei zwei weiteren Isolierungen stellten sich die Vorläuferzellpellets größer dar, sodass hier 16,6% (Lew-m7) und 12,5% (Lew-m 1) der Zellen zur Transplantation verwendet wurden. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der Isolierung sowie die zu den jeweiligen Lew-m gehörigen Transplantationsempfänger zusammen.

Tab. 4: Viabilitäten und Zellzahlen von Hc nach Easycoll, sowie die zur kLZTx verwendeten Anteile der Vorläuferfraktionen von den Isolierungen von Lew-m 1-8 und deren kLZTx-Empfänger

	Hc-Viabilität in % nach Easycoll®	Vitale Hc in Mio. nach Easycoll®	Anteil der Vorläuferfraktion für kLZTx in %	kLZTx-Empfänger
Lew-m 1	68,9	36	12,5	A1
				B2
				B4
Lew-m 2	71,5	11	25	A2
Lew-m 3	79,9	48,4	25	A3
				A4
Lew-m 4	63,8	74,6	50	B1
				B3
Lew-m 5	72,6	19,1	25	B5
				C1
				C4
				C5
Lew-m 6	76,4	42,98	25	C2
				C3
				D3
Lew-m 7	71,7	67,5	16,6	D1
				D2
				D4
Lew-m 8	73,8	65,9	25	D5
Mittelwert	72,325	45,685		

3.3 Ergebnisse der Zellkulturversuche

3.3.1 Hepatocytenisolierungen für Zellkulturanalysen

Die Isolierungen der Hepatocyten von Lew-m A-C ergaben eine mittlere Viabilität von 83,3 %, sowie eine mittlere Gesamtzellzahl von 92×10^6 .

3.3.2 Auswertung der Laboranalysen der Hepatocyten-Kulturen

Durch die Laboranalysen ergaben sich für jeden der zu bestimmenden Parameter je drei Werte pro Tag und Tier für Mono- und Kokulturen. Sowohl für Mono- als auch Kokultur wurden die Ergebnisse je Tag pro Tier gemittelt. Diese tierspezifischen Mittelwerte wurden wiederum über alle Tiere gemittelt, sodass die individuelle Isolationsviabilität berücksichtigt wurde und sich ein Gesamt-Tagesmittel für alle Parameter ergab ($n=3$). Die Abbildungen 8 A-D und die Tabelle 5 fassen die Ergebnisse der Laboranalysen für die einzelnen Parameter im Zeitverlauf zusammen.

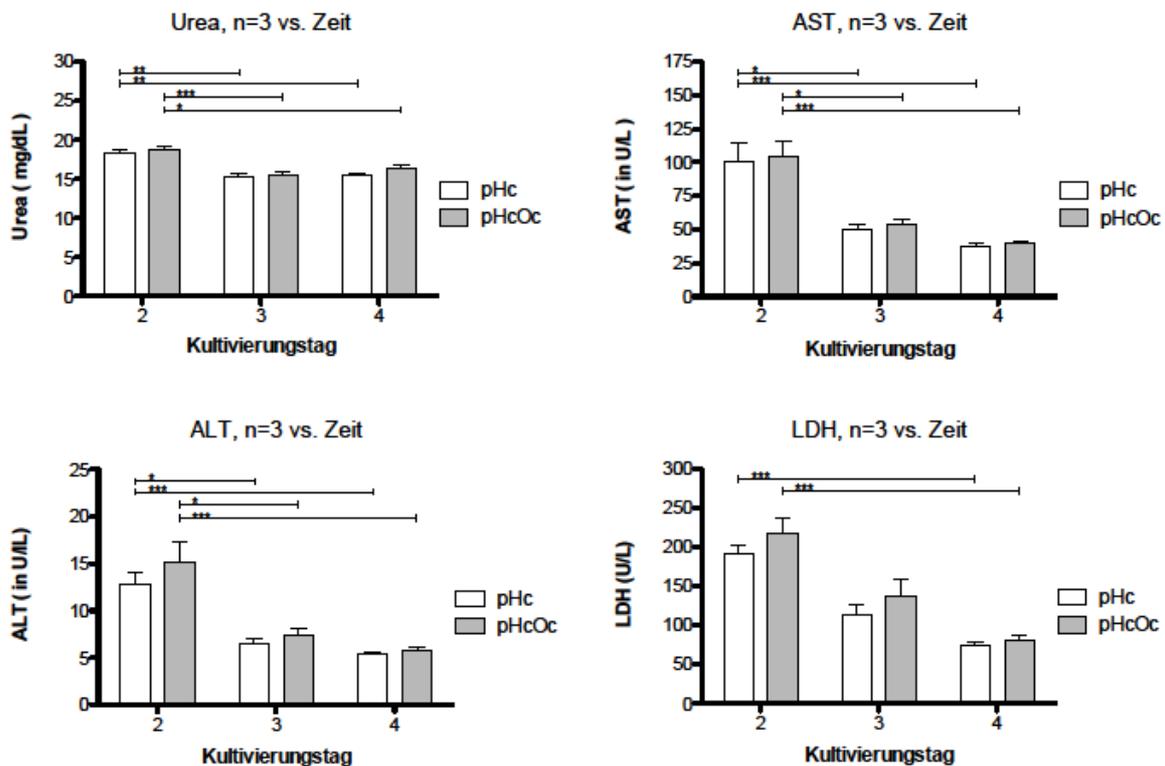


Abb. 7: Mittelwerte (MW \pm SEM) für [A] Harnstoff (Urea) in mg/dL, [B] Aspartat-Aminotransferase (AST) in U/L, [C] Alanin-Aminotransferase (ALT) in U/L und [D] Lactat-Dehydrogenase (LDH) in U/L von primärer Hepatocyten-Monokultur (pHc) und primärer Hepatocyten-Vorläuferzellen-Kokultur (pHcOc) über die Zeit (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Tab. 5: Mittelwerte und Standardfehler für Harnstoff (Urea), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) von primärer Hepatocyten-Monokultur (pHc) und primärer Hepatocyten-Vorläufer-Kokultur (pHcOc)

	pHc		pHcOc	
	Mittelwert	Standardfehler	Mittelwert	Standardfehler
Urea (mg/dL)				
Tag 2	18,2	0,54	18,8	0,46
Tag 3	15,3	0,27	15,5	0,32
Tag 4	15,5	0,23	16,4	0,35
AST (U/L)				
Tag 2	100,9	12,85	104,4	10,63
Tag 3	49,3	4,35	53,7	3,67
Tag 4	37,9	1,45	40,1	1,34
ALT (U/L)				
Tag 2	12,9	1,14	15,1	2,03
Tag 3	6,5	0,45	7,4	0,57
Tag 4	5,4	0,16	5,8	0,26
LDH (U/L)				
Tag 2	192,4	10,63	217,4	18,8
Tag 3	113,1	13,04	137,5	19,65
Tag 4	73,9	4,14	81,8	5,08

Die Werte aller 4 Parameter verhielten sich sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur gleichsinnig über die Zeit. Für Urea fielen die Werte zunächst von Tag 2 zu Tag 3 ab, wobei sich die Werte für pHc sehr signifikant ($p < 0,01$) und für pHcOc hochsignifikant ($p < 0,005$) unterschieden. Am Tag 4 zeigte sich wiederum ein leichter Anstieg der Urea-Werte, wobei die Werte allerdings weiterhin signifikant unter denen von Tag 1 lagen (pHc $p < 0,01$, pHcOc $p < 0,05$). Die Werte für AST, ALT und LDH fielen in beiden Kulturen gleichermaßen über die Zeit ab. Hierbei unterschieden sich die AST- und ALT-Werte für Tag 2 und Tag 3 signifikant ($p < 0,05$). Die Werte von Tag 4 lagen für AST, ALT und LDH hochsignifikant ($p < 0,005$) unter denen von Tag 2.

Obwohl für alle vier Parameter die mittleren Werte der Kokulturen über denen der Monokultur liegen, unterscheiden sich diese nicht signifikant.

3.4 Immunhistochemische Analysen und Histologie

3.4.1 Proliferationsanalysen Retrorsin-behandelter DA-Tiere

Zur Verifizierung des Retrorsinmodells wurden PCNA-Färbungen angefertigt. Abb. 8 zeigt exemplarisch PCNA-gefärbte Schnitte von DA-Lebern an verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation von Retrorsin.

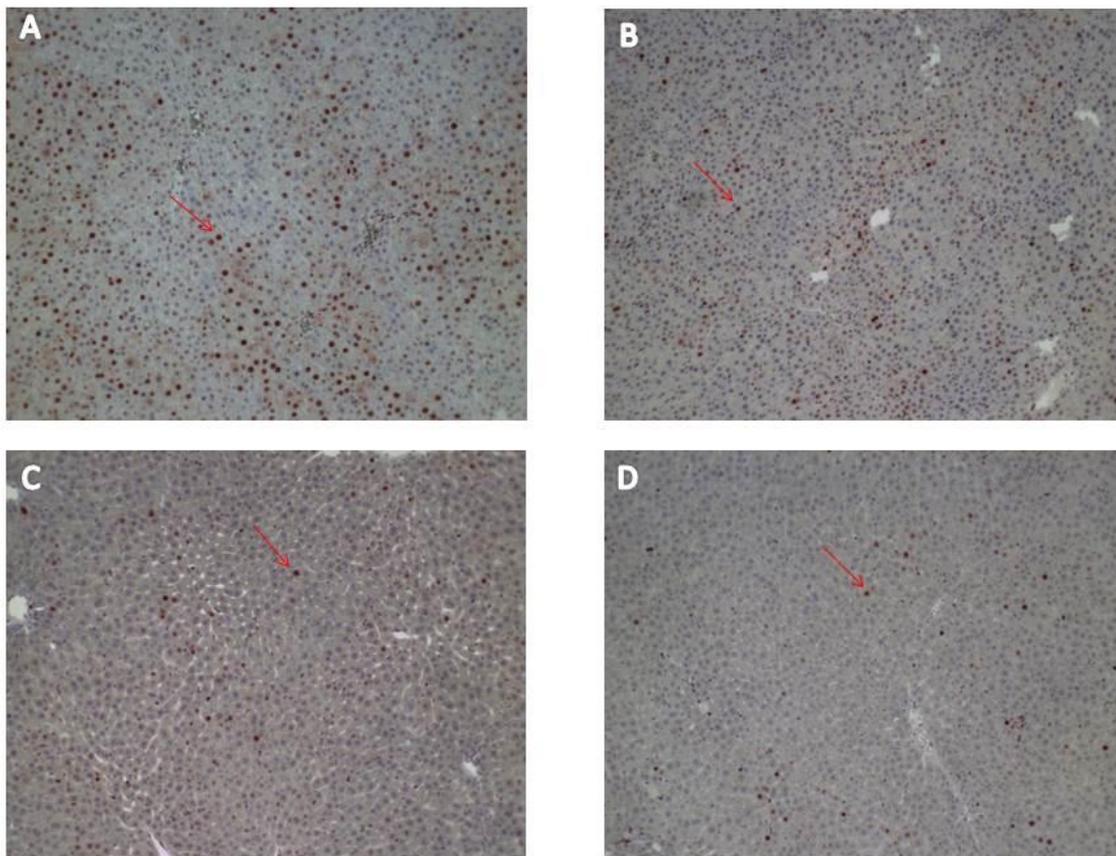


Abb. 8: Verifizierung des Retrorsin-Modells anhand immunhistologischer Proliferationsfärbungen (PCNA) von Leberschnitten bei DA-Tieren am Tag (A) 0, (B) 39, (C) 45, (D) 50 nach der ersten Retrorsin-Injektion. Roter Pfeil=PCNA positiver Zellkern

Abb. 8A veranschaulicht die Verhältnisse in der DA-f Leber an Tag 0 nach Retrorsin-Applikation. Es sind sehr viele PCNA-positiv gefärbte Zellkerne zu erkennen, was darauf hinweist, dass sich zu diesem Zeitpunkt ein großer Anteil an Hepatocyten in der Zellteilung befinden. In Abb. 8b, 8C und 8D ist zu erkennen, dass die Anzahl PCNA-positiv gefärbter Zellkerne bis zum Tag 45 nach Applikation stark abnimmt, um am Tag 50 nach Applikation wieder leicht anzusteigen.

3.4.2 Ermittlung des Isolierungszeitpunktes für Leberzellen aus Zellspendertieren

Um den optimalen Zeitpunkt zur Isolierung von Hc und Lebervorläuferzellen zu ermitteln, wurden an Paraffinschnitten der Leber von 2-AAF/PH-behandelten Lew-m immunhistochemische Färbungen vorgenommen. Hierbei wurden unterschiedliche Finalisierungszeitpunkte, jeweils sechs Tage nach 2-AAF-Applikation, zum einen ohne PH sowie 7, 9, 11 und 14 Tage nach PH überprüft. Die PCNA-Färbung diente dazu, den Zeitpunkt der maximalen Zellproliferation nach PH zu finden. Es wurde außerdem eine selektive Oc-Färbung durchgeführt (OV-6), um den Zeitpunkt nach PH zu ermitteln, an dem die höchste Ausbeute von Oc zu erwarten ist.

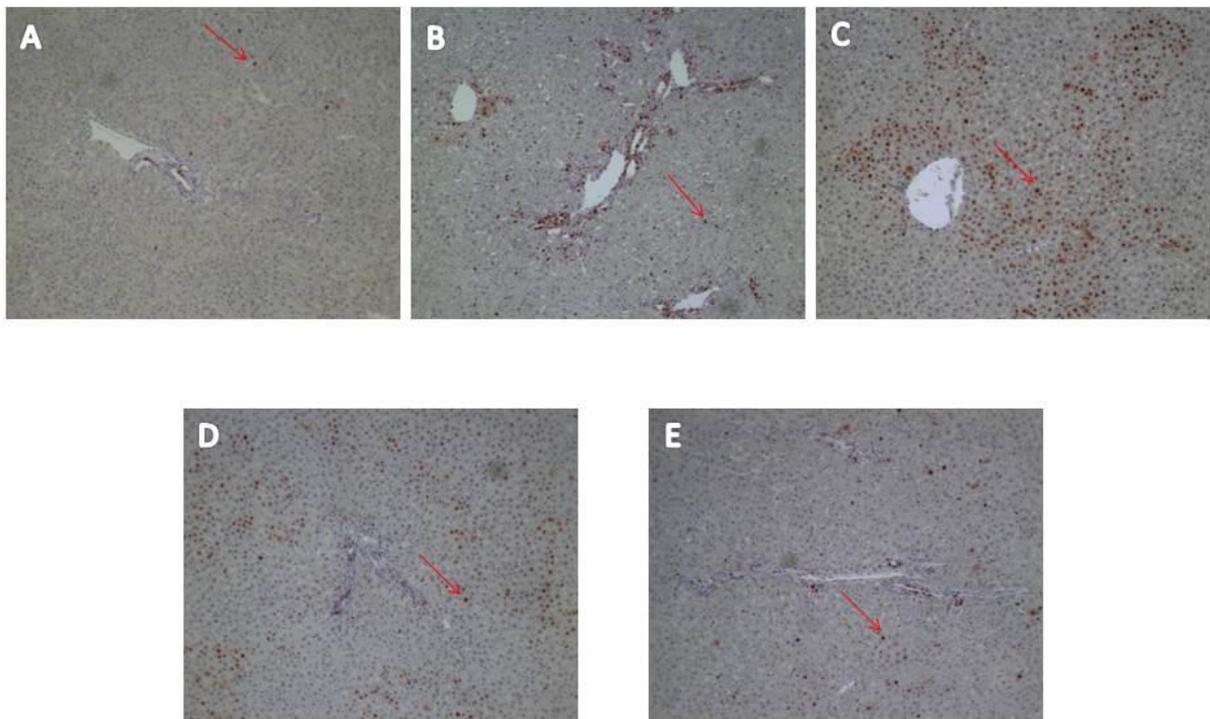


Abb. 9: Immunhistologische Proliferationsfärbung (PCNA) der Rattenleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2-AAF und PH. PCNA-Färbung 6 Tage post 2-AAF (A) ohne PH und (B) 7 Tage, (C) 9 Tage, (D) 11 Tage und (E) 14 Tage nach PH. Roter Pfeil = PCNA positiver Zellkern

Die PCNA-Färbungen legen nahe, dass der Anteil an Zellen mit proliferativen Eigenschaften im Verlauf bis zum 9. Tag nach PH zunimmt, um danach wieder abzufallen (s. Abb. 9). Hierbei handelte es sich um eine subjektive Auswertung der Schnitte ohne Zählung PCNA-positiver Zellkerne. Die OV-6-Färbungen hingegen zeigen, dass der Anteil an OV-6-positiven Oc am Tag 7 nach erfolgter PH am größten ist (s. Abb. 10).

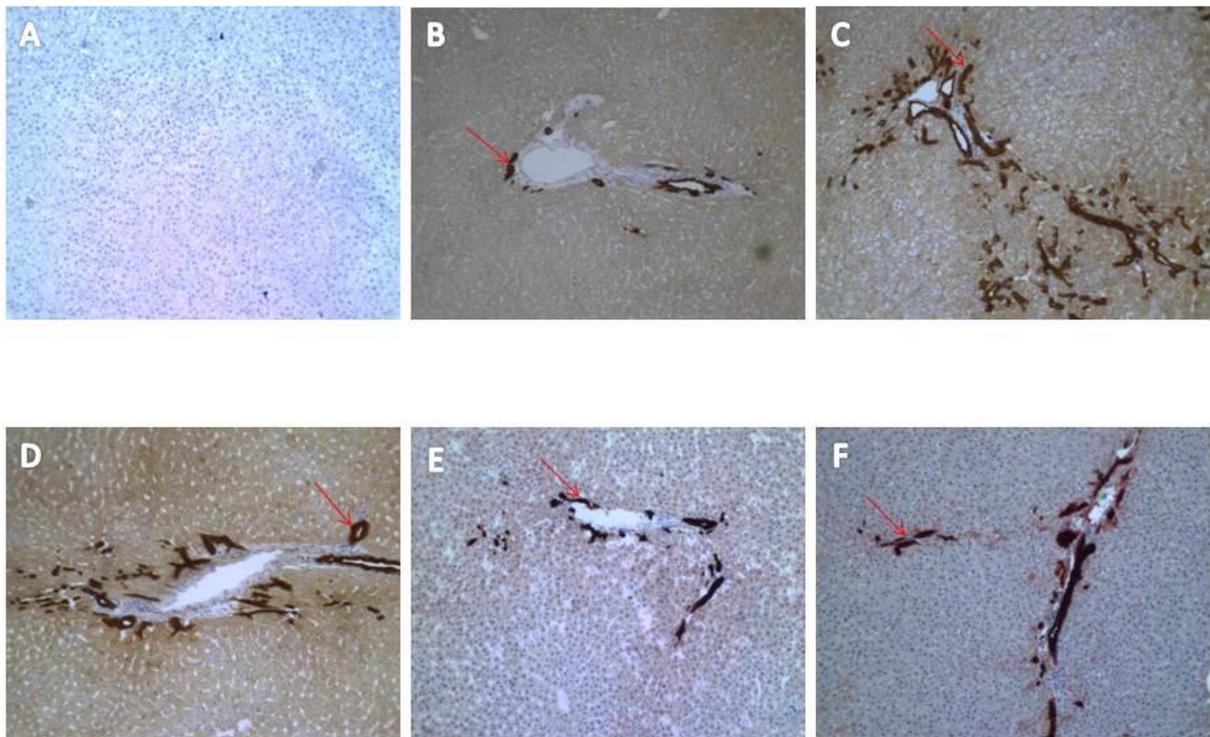


Abb. 10: Immunhistologische OV-6-Färbung hepatischer Vorläuferzellen (Oc) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2-AAF-Implantation und PH in der Rattenleber. OV-6-Färbung (A) nativ, und 6 Tage nach 2-AAF (B) ohne PH, (C) 7 Tage, (D) 9 Tage, (E) 11 Tage und (F) 14 Tage nach PH. Roter Pfeil = OV-6 positive Zelle

3.5 Auswertung der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FisH)

Zum Nachweis der Repopularisierung der weiblichen Spenderleber mit männlichen Spenderhepatocyten wurden die Y-Chromosomen dieser Zellen mittels FisH markiert. Die Abb. 11 stellt beispielhaft eine solche Markierung dar. Durch das in 2.4.6 beschriebene Verfahren konnten die Y-Chromosomen im untersuchten Lebergewebe detektiert und ausgewertet werden. Die Zahl der für Y-Chromosomen positiv gefärbten Zellkerne wurde prozentual auf die

Gesamtheit aller Zellkerne des betreffenden Schnitts bezogen. Die Ergebnisse der Einzelschnitte wurden für die einzelnen Lebersegmente, für die gesamte Leber des jeweiligen Tieres, sowie gruppenspezifisch gemittelt (Y-positive Kerne (%)) und miteinander korreliert. Des Weiteren wurden Standardabweichung (SD) und Standardfehler vom Mittelwert (SEM) berechnet. Da bei allen weiblichen Kontrolltieren sämtliche Schnitte negativ für Y-Chromosomen waren, werden diese der Übersicht halber in den folgenden Tabellen nicht aufgeführt.

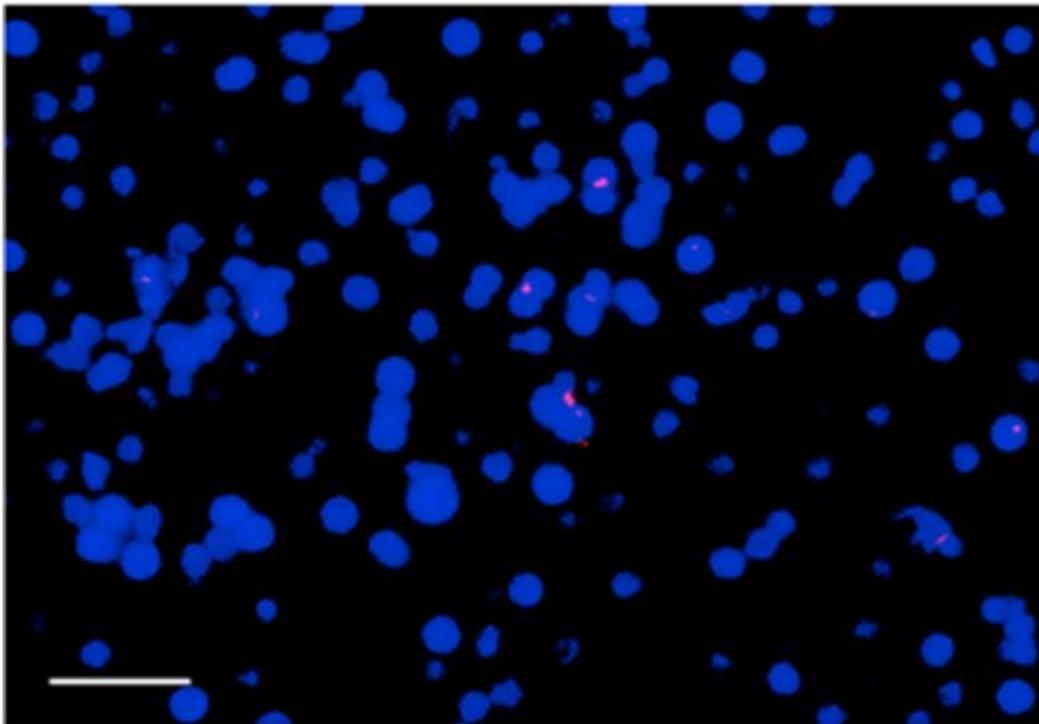


Abb. 11: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Visualisierung der Y-Chromosomen transplanteder, männlicher Zellen am Beispiel von Tier D5 der Gruppe D, 90 Tage nach kombinierter LTx kLZTx, blau= Zellkerne (DAPI-Färbung), rot=Y-Chromosomen (FisH-Färbung). (Maßstab: 50µm)

3.5.1 Auswertung der Einzeltiere nach Gruppen geordnet

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse nach Versuchsgruppen geordnet für die einzelnen Tiere dargestellt.

Tab. 6: Mittelwerte Y-positiver Kerne (%), SD(%) und SEM(%) der Einzeltiere der Versuchsgruppen A-D

Gruppe	Tier	Mittelwert Y-positiver Kerne (%)	SD (%)	SEM(%)
A	A1	22,93	2,268	1,31
	A2	12,12	6,475	3,237
	A3	12,19	6,379	3,19
	A4	9,379	4,802	2,401
B	B1	7,596	1,644	0,7352
	B2	11,02	3,026	1,747
	B3	7,517	3,026	3,034
	B5	7,751	1,808	1,044
C	C1	7,46	1,784	0,892
	C2	6,941	5,325	3,075
	C3	6,914	5,764	3,328
	C4	6,649	4,084	2,042
	C5	8,129	4,7	2,35
D	D2	16,79	5,518	2,759
	D3	15,88	6,991	3,496
	D4	10,71	5,33	2,176
	D5	19,13	4,051	1,654

Auswertung Gruppe A

Die Abb. 12 A stellt die Ergebnisse für die Tiere der Gruppe A zur Veranschaulichung als Balkendiagramm dar. Der Mittelwert des prozentualen Anteils der Y-positiven Kerne (MW Y) bei A1 betrug 22,93% mit einem Standardfehler vom Mittelwert (SEM) von 1,31%. A2 zeigte ein MW Y von 12,12% \pm 3,24% SEM. Bei Tier A3 betrug der MW Y 12,19% \pm 3,19% SEM. Bei A4 war der MW Y 9,40% \pm 2,40% SEM.

Auswertung Gruppe B

Die Abb. 12 B veranschaulicht die Ergebnisse der Gruppe B als Balkendiagramm. Tier B1 zeigte ein MW Y von 7,60% \pm 0,74% SEM. Bei B2 ergab sich ein MW Y von 11,02% \pm 1,75% SEM.

Der erhobene MW Y für B3 betrug $7,52\% \pm 1,36\%$ SEM. Bei B5 betrug der MW Y $7,75\% \pm 1,04\%$ SEM.

Auswertung der Gruppe C

In Abb. 12 C zeigen Balkendiagramme die Ergebnisse der Gruppe C. Für C1 ergab sich ein MW Y von $7,46\% \pm 0,89\%$ SEM. Bei Tier C2 betrug der MW Y $6,94\% \pm 3,08\%$ SEM. Der MW Y von C3 lag bei $6,91\% \pm 3,33\%$ SEM. C4 zeigte einen MW Y von $6,65\% \pm 2,04\%$ SEM. Bei C5 wurde ein MW Y von $8,13\% \pm 2,35\%$ SEM ermittelt.

Auswertung der Gruppe D

In Abb. 12 D sind die Ergebnisse der Gruppe D graphisch als Balkendiagramm dargestellt. Für das Tier D2 ergaben sich ein MW Y von $16,79\% \pm 2,76\%$ SEM. Bei D3 betrug der MW Y $15,88\% \pm 3,50\%$ SEM. Für D4 errechneten sich ein MW Y von $10,71\% \pm 2,18\%$ SEM. Der MW Y von D5 lag bei $19,13\% \pm 1,65\%$ SEM.

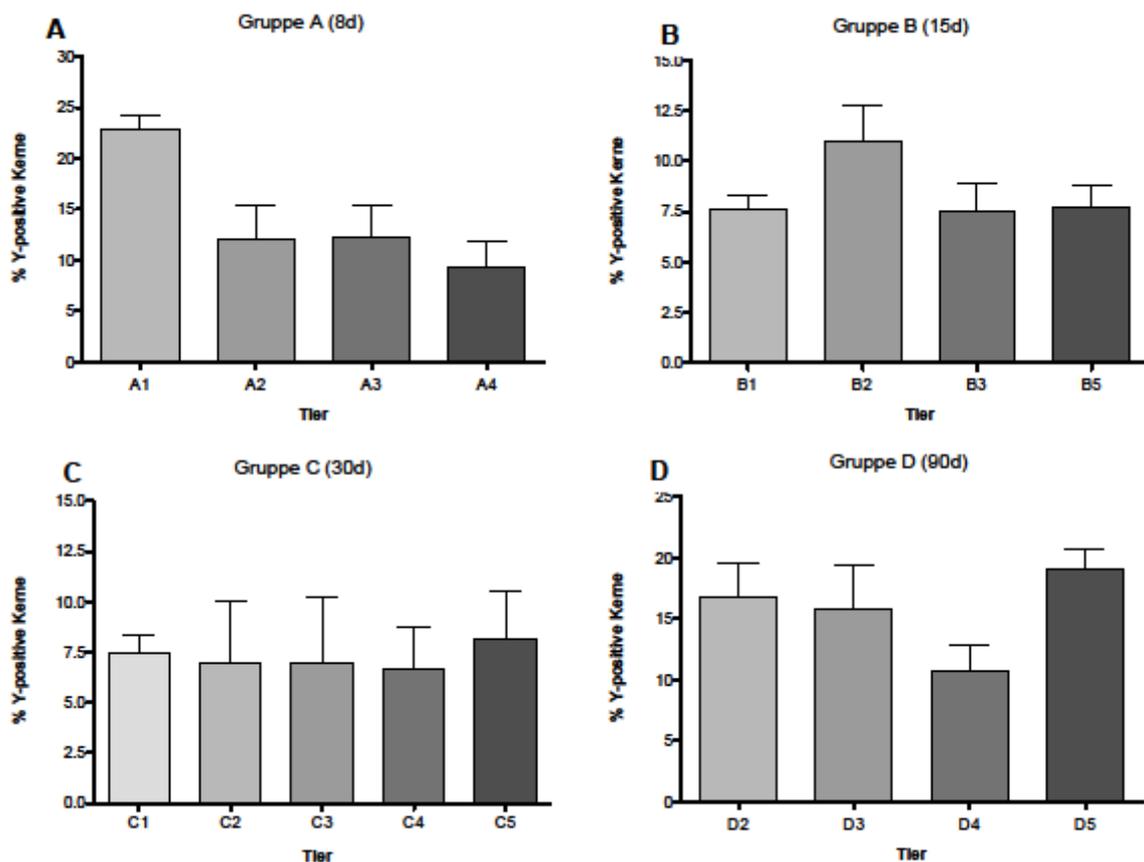


Abb. 12: Darstellung der Mittelwerte Y-positiver Kerne pro Tier (in $\% \pm$ SEM) für [A] der Tiere A1, A2, A3 und A4, [B] der Tiere B1, B2, B3 und B5, [C] der Tiere C1, C2, C3, C4 und C5 und [D] der Tiere D2, D3, D4 und D5 ermittelt durch FisH

3.5.2 Gruppenübergreifende Auswertung der FisH-Ergebnisse

Um einen Überblick über das Verhältnis der einzelnen Gruppen mit den verschiedenen Finalisierungszeitpunkten untereinander zu erhalten, wurden für die Ergebnisse der Einzeltiere je Gruppe der Mittelwert (MW Y) sowie der Standardfehler (SEM) berechnet. Die Abb. 13 stellt diese Gruppenmittelwerte mit SEM dar. Die Gruppen A, B und D bestanden aus jeweils 4 Versuchstieren, während Gruppe C 5 Versuchstiere beinhaltete. Der MW Y der Gruppe A (8 Tage) betrug $14,15\% \pm 2,59\%$ SEM. Für Gruppe B (15 Tage) ergab sich ein MW Y von $8,47\% \pm 0,74\%$ SEM. Bei Gruppe C, deren Finalisierungszeitpunkt an Tag 30 nach LTx und kLZTx lag, betrug der MW Y $7,22\% \pm 0,24\%$ SEM. Der ermittelte MW Y der Gruppe D (90 Tage) betrug $15,63\% \pm 1,54\%$ SEM. Der MW Y der Gruppe C unterschied sich hierbei signifikant von dem jeweiligen MW Y der Gruppen A und D.

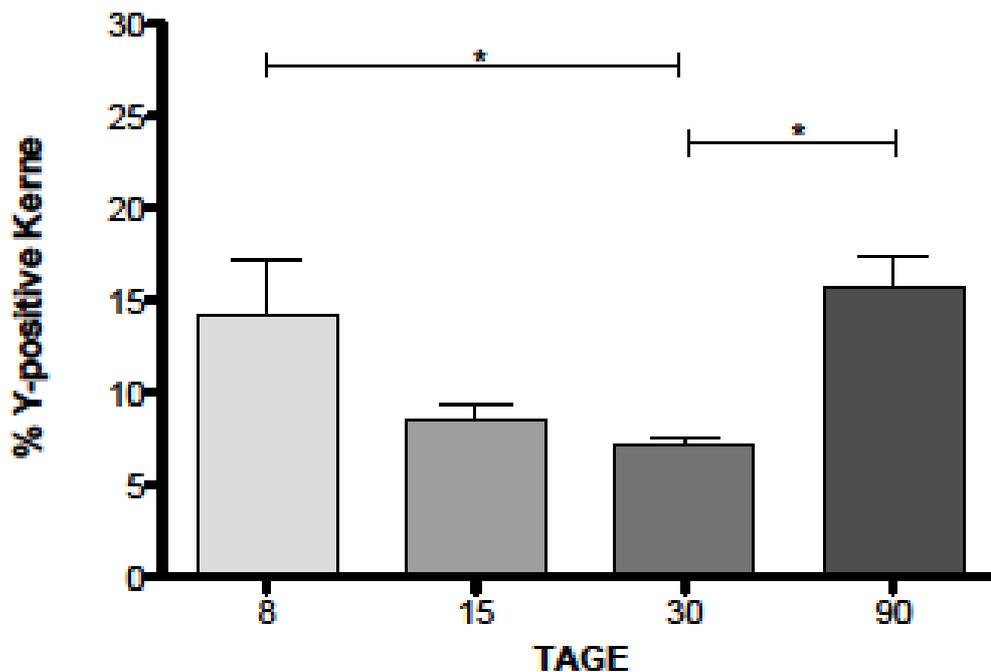


Abb. 13: Darstellung der Mittelwerte Y-positiver Kerne (in % \pm SEM) der Finalisierungsgruppen 8 (A), 15 (B), 30 (C) und 90 (D) Tage nach LTx und kLZTx ermittelt durch FisH (* $p < 0,05$)

3.6 Auswertung der qPCR zur Y-Chromosomendetektion

Für einen weiteren Nachweis der Repopularisierung der weiblichen Spenderleber mit männlichen Spenderhepatocyten, wurde das SRY-Gen der Y-Chromosomen dieser Zellen mittels qPCR nachgewiesen und quantifiziert. Des Weiteren dienten die Ergebnisse der qPCR zur Korrelation und Bewertung der Ergebnisse der FisH-Analysen. Durch das in 2.5 beschriebene Verfahren wurde der prozentuale Anteil männlichen Spenderzellen ermittelt und auf die Gesamtheit aller Zellen des betreffenden Tieres bezogen. Die ermittelten 4 Rohwerte für jedes Tier bestehend aus Isolation 1-Pool A, Isolation 1-Pool B, Isolation 2-Pool A und Isolation 2-Pool B wurden tierspezifisch, sowie gruppenspezifisch gemittelt (Mittelwert SRY-positiver Kerne(%), MW SRY) und mit Hilfe der Standardkurve auf eine Gesamtzellmenge von 100% bezogen. Es wurden Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SEM) berechnet.

3.6.1 Auswertung der Einzeltiere nach Gruppen geordnet

Tabelle 7 stellt die Ergebnisse nach Versuchsgruppen geordnet für die einzelnen Tiere dar.

Tab. 7: Mittelwerte SRY-positiver Kerne (%), SD(%) und SEM(%) der Einzeltiere der Versuchsgruppen A-D ermittelt durch qPCR

Gruppe	Tier	Mittelwert SRY-positive Kerne (%)	SD (%)	SEM(%)
A	A1	0,362	0,219	0,109
	A2	0,084	0,07591	0,03795
	A3	0,0285	0,03478	0,01739
	A4	0,1233	0,02367	0,01183
B	B1	2,039	1,567	0,7833
	B2	1,311	1,094	0,547
	B3	1,426	1,323	0,6616
	B4	0,052	0,055	0,027
C	C1	0,1315	0,06981	0,03491
	C2	0,6775	0,3869	0,1934
	C3	0,3048	0,2398	0,1199
	C4	1,131	0,2201	0,11
	C5	0,118	0,047	0,024
D	D1	1,429	0,095	0,048
	D2	7,522	1,176	0,5879
	D3	23,23	3,531	1,765
	D4	9,878	5,655	2,827
	D5	28,71	9,643	4,821

Auswertung der Gruppe A

Abb. 14 A veranschaulicht die einzelnen Prozentsätze SRY-positiver Kerne pro Tier, sowie deren SEM(%) der Gruppe A die sich aus der qPCR-Analyse ergaben. Bei A1 wurde ein MW SRY von $0,362\% \pm 0,109\%$ SEM ermittelt. A2 weist einen MW SRY von $0,084\% \pm 0,038\%$ SEM auf. Bei dem Tier A3 betrug der MW SRY $0,029\% \pm 0,017\%$ SEM. Tier A4 zeigte ein MW SRY von $0,123\% \pm 0,012\%$ SEM. Die Ergebnisse von A1 und A3 unterschieden sich hierbei sehr signifikant ($p < 0,01$).

Auswertung der Gruppe B

In Abb. 14 B sind die Ergebnisse für Gruppe B als Balkendiagramm dargestellt. Der MW SRY für B1 betrug $2,039\% \pm 0,783\%$ SEM. B2 zeigte einen MW SRY von $1,311\% \pm 0,547\%$ SEM. Bei Tier B3 ergab sich ein MW SRY von $1,426\% \pm 0,662\%$ SEM. Der MW SRY für B4 betrug $0,052\% \pm 0,027\%$ SEM. Es zeigte sich hierbei ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen dem MW SRY von B1 und B4.

Auswertung der Gruppe C

Die Abb. 14 C zeigt die Ergebnisse der Gruppe C als Balkendiagramm. Für das Tier C1 ergaben sich ein MW SRY von $0,131\% \pm 0,035\%$ SEM. Bei C2 betrug der MW SRY $0,677\% \pm 0,193\%$ SEM. C3 zeigte ein MW SRY von $0,305\% \pm 0,120\%$ SEM. Der MW SRY für C4 betrug $1,131\% \pm 0,11\%$ SEM. Tier C5 zeigte ein MW SRY von $0,118\% \pm 0,024\%$ SEM. Die MW SRY von C4 und C5 unterschieden sich signifikant.

Auswertung der Gruppe D

In Abb. 14 D sind die Ergebnisse der Gruppe D zur Veranschaulichung als Balkendiagramm dargestellt. D1 zeigte hierbei einen MW SRY von $1,429\% \pm 0,048\%$ SEM. D2 zeigte einen MW SRY von $7,522\% \pm 0,588\%$ SEM. Für Tier D3 ergab sich ein MW SRY von $23,231\% \pm 1,765\%$ SEM. Der MW SRY von D4 betrug $9,878\% \pm 2,827\%$ SEM. D5 zeigte einen MW SRY von $28,713\% \pm 4,821\%$ SEM. Es zeigte sich, dass sich der MW SRY von D1 signifikant ($p < 0,05$) von D3 und sehr signifikant ($p < 0,01$) von D5 unterschied.

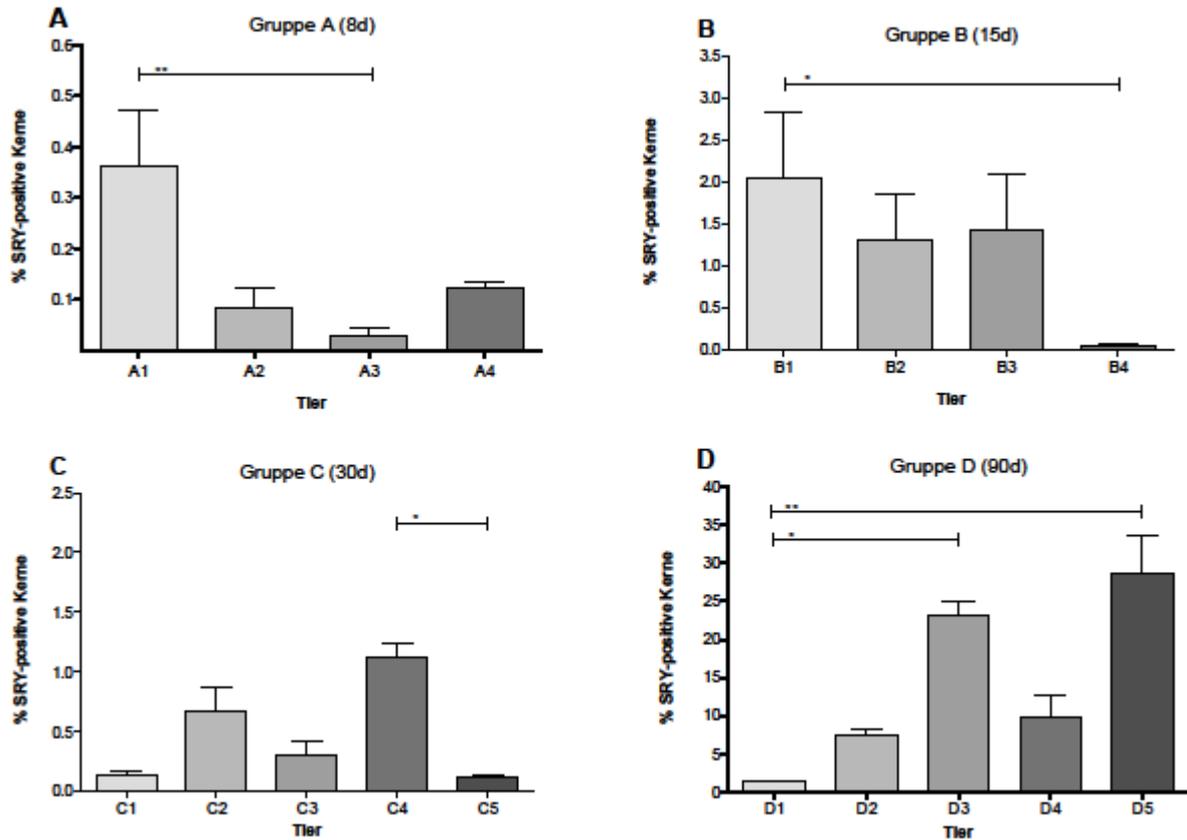


Abb. 14: Darstellung der Mittelwerte SRY-positiver Kerne pro Tier (in % \pm SEM) für [A] der Tiere A1, A2, A3 und A4, [B] der Tiere B1, B2, B3 und B4, [C] der Tiere C1, C2, C3, C4 und C5 und [D] der Tiere D1, D2, D3, D4 und D5 ermittelt durch qPCR (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

3.6.2 Gruppenübergreifende Analyse der qPCR-Ergebnisse

Um einen Überblick über das Verhältnis der einzelnen Gruppen mit den verschiedenen Finalisierungszeitpunkten untereinander zu erhalten, wurden für die Ergebnisse der Einzeltiere je Gruppe der Mittelwert (MW SRY) sowie der Standardfehler (SEM) berechnet. Die Abb. 15 stellt diese Gruppenmittelwerte mit SEM dar. Die Gruppen A und B bestanden aus jeweils 4 Versuchstieren, während Gruppe C und D jeweils 5 Versuchstiere beinhalteten. Der MW SRY der Gruppe A betrug $0,150\% \pm 0,074\%$ SEM. Für Gruppe B ergab sich ein MW SRY von $1,207\% \pm 0,417\%$ SEM. Bei Gruppe C betrug der MW SRY $0,473\% \pm 0,193\%$ SEM. Der ermittelte MW SRY der Gruppe D betrug $14,15\% \pm 5,091$ SEM. Der MW SRY der Gruppe A unterschied sich hierbei signifikant von dem MW SRY der Gruppe D.

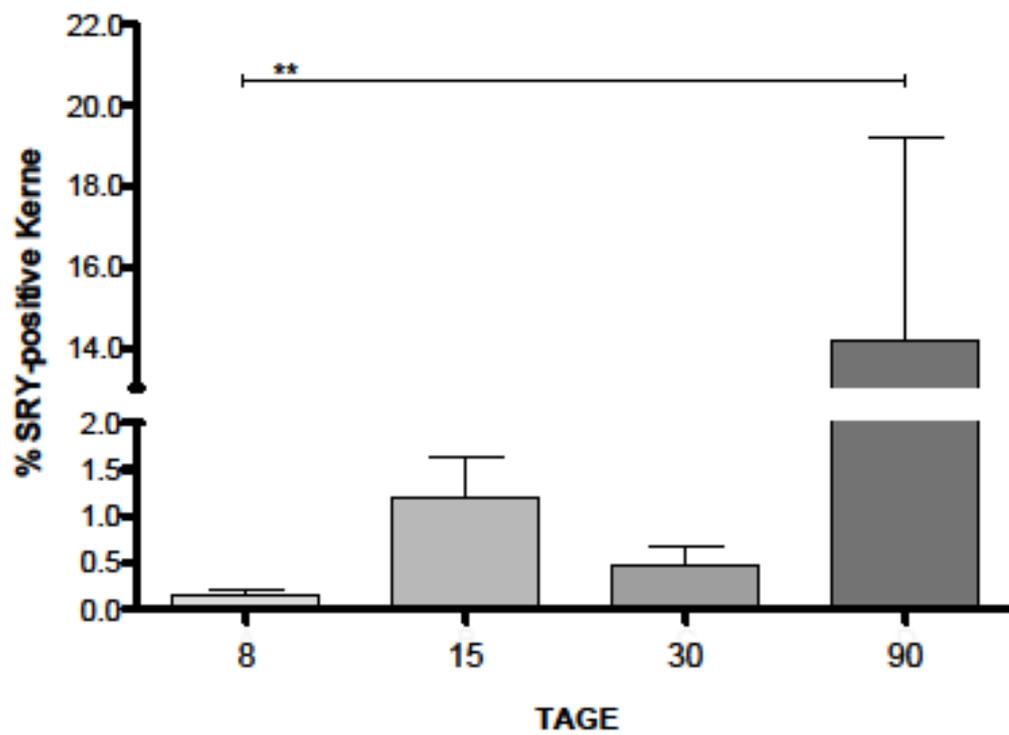


Abb. 15: Darstellung der Mittelwerte SRY-positiver Kerne (in % \pm SEM) der Finalisierungsgruppen 8 (A), 15 (B), 30 (C) und 90 (D) Tage nach LTx und kLZTx (**p < 0,01) ermittelt durch qPCR

4. Diskussion

Trotzdem die LTx schon seit 1984 durch das National Institute of Health als Standardverfahren zur Therapie bei terminaler Leberinsuffizienz anerkannt wurde, existieren auch heute noch große Probleme auf diesem Gebiet. Sowohl vielseitige Nebenwirkungen der oft lebenslang nötigen Immunsuppression, als auch Abstoßungsgeschehen der Spenderorgane durch das Immunsystem des Empfängers stehen heutzutage im Fokus der Forschung.

Es ist das Ziel des Projektes, dem die vorliegende Arbeit angehört, Lösungsansätze für diese beiden Teile der Lebertransplantationsforschung zu finden. Durch kombinierte Leber-Leberzelltransplantation soll es ermöglicht werden, ein Spenderorgan zu schaffen, das vom Immunsystem des Empfängers toleriert wird. Somit könnten lebenslängliche Immunsuppressionsprotokolle sowie die Problematik der Organabstoßung möglicherweise der Vergangenheit angehören. Hierfür sollen neben einer allogenen Spenderleber erstmals autologe Hepatocyten sowie autologe hepatische Progenitorzellen (hPc) transplantiert werden. Es wird postuliert, dass diese kombinierte autologe Zelltransplantation eine suffiziente Repopularisierung des allogenen Spenderorgans bewirkt und zu operationaler Toleranz führen kann.

Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedenste Methoden zum Beweis der Durchführbarkeit des Projektes zu etablieren und deren Ergebnisse zu analysieren.

4.1 Diskussion der Vorversuchsergebnisse

4.1.1 Blockierung des Zellzyklus im allogenen Spenderorgan mittels Retrorsin

Die in der Literatur beschriebene Wirkung von Retrorsin (60, 61) auf den Zellzyklus der Hepatocyten konnte durch die Versuche in dieser Arbeit verifiziert werden. Wie in 4.4.1 zu sehen, führte die zweimalige Behandlung der DA-f Ratten mit 30 mg/kg KG i.p. im Abstand von 14 Tagen zu einer sicheren Inhibition des Zellzyklus des Großteils der Hepatocyten. Zudem konnte anhand von Proliferationsanalysen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Retrorsin-Applikation der Zeitpunkt mit der niedrigsten Proliferationsrate im Lebergewebe ermittelt werden. Während die Anzahl der proliferierenden Zellen im Lebergewebe bis Tag 45 nach Retrorsin-Applikation stetig abnimmt, ist an Tag 50 wieder eine Zunahme an proliferierenden Zellen zu sehen. Für den Beweis der Durchführbarkeit des Projekts ist es essentiell, einen Selektionsvorteil der Spenderzellen gegenüber den Hepatocyten im Spenderorgan zu etablieren. Aus diesem Grund werden alle Spenderorganentnahmen und damit alle LTx am Tag 45 nach Retrorsin-Applikation durchgeführt, um damit eine sichere Zellzyklusinhibition im Spenderorgan zu gewährleisten.

4.1.2 Induktion und Proliferationsaktivierung hepatischer Vorläuferzellen

Um einen weiteren Selektionsvorteil für die transplantierten Hepatocyten und hepatische Progenitorzellen zu schaffen, wurden die Zellspendertiere (Lew-m) vorbehandelt. Nach eingehender Literaturrecherche wurde das 2-AAF/PH-Behandlungsprotokoll als die vielversprechendste Methode zur Induktion von hepatischen Vorläuferzellen ausgewählt (53, 64, 65). Da in der Literatur jedoch kein Konsens über den Isolationszeitpunkt mit höchster Vorläufer-Ausbeute (52-54, 64, 66-69) besteht, wurden im Rahmen dieser Arbeit Untersuchungen zur Bestimmung des genauen Zeitpunktes vorgenommen. Diese dienten auch der Bestimmung des Zeitpunkts mit der größten proliferativen Aktivität.

Wie in 3.4.2 zu sehen, ergaben die Versuche, dass an Tag 7 nach PH der Anteil an OV-6 positiven Oc, also hepatischer Vorläuferzellen, am größten ist. Zu diesem Ergebnis kamen die Arbeitsgruppen um Shimano et al. (68) und Batusic et al. (67) ebenfalls. Allerdings ist sowohl der proliferative Zellanteil als auch der Oc-Anteil zum Isolierungszeitpunkt von entscheidender Bedeutung für die Autologisierung und Repopularisierung des allogenen Spendertransplantats. Das Maximum an proliferierenden Zellen scheint jedoch erst am Tag 9 nach erfolgter PH erreicht zu sein. An Tag 7 post PH ist kaum proliferative Aktivität im Lebergewebe zu finden. Hingegen sind an Tag 9 noch viele OV-6 positive Oc zu erkennen. Da dieser Zeitpunkt durch die Arbeiten von Petersen et al. (64), Jelnes et al. (54) und Shupe et al. (53) sogar als der Tag mit höchster Oc-Ausbeute bestätigt wurde, wurden alle Zellisolation im Rahmen dieser Arbeit am Tag 9 nach PH durchgeführt, um hiermit einen Kompromiss aus maximaler Proliferationsaktivität und große Vorläuferzellzahl zu gewährleisten.

4.2 Diskussion der Hauptversuchsergebnisse

4.2.1 Verhalten der isolierten primären Hepatocyten in Mono- und Kokultur

Um die Qualität der isolierten Hc, sowie den Einfluss der Vorläuferzellfraktion auf die Hc zu evaluieren, wurden Zellkulturversuche durchgeführt. Die Viabilität der isolierten Hc für die in vitro-Versuche lag im Mittel bei 83,3% und es wurden im Durchschnitt $92,0 \times 10^6$ vitale Zellen pro Leber isoliert. Damit lag sowohl die Viabilität als auch die Zellausbeute über den Ergebnissen der Zellisolationen für die Zelltransplantation im Rattenmodell, deren mittlere Viabilität bei 72,3% und deren Ausbeute bei $45,7 \times 10^6$ Zellen lag.

Es existierte ein hoher logistischer Aufwand, um die Vorbehandlungen von DA-f und Lew-m auf einen festgelegten Transplantationstag abzustimmen. Ein nicht Durchführen der Transplantationen zu den bestimmten Zeitpunkten, hätte zum Ausschluss der vorbehandelten Tiere aus der Versuchsreihe geführt. Die erneute Durchführung einer abgebrochenen

Transplantation hätte den Einsatz weiterer drei Versuchstiere (Lew-m, Lew-f, DA-f) bedeutet, was aus ethischer Sicht nicht zu vertreten war. Aus diesem Grund war es unumgänglich auch Zelltransplantationen im Rahmen der LTx-kLZTx-Versuche durchzuführen, bei denen die Hc-Isolierungen eine geringere Zellviabilität oder –ausbeute aufwiesen. Die Zellkulturversuche hingegen, waren weitestgehend terminunabhängig. Aus diesem Grund konnten drei Zellisolationen gewählt werden, die sowohl hohe individuelle Viabilitäten als auch untereinander geringe Unterschiede hinsichtlich der Viabilitäten aufwiesen (s. 3.3.1).

Die gemessenen Parameter in den Kulturen dienten zur Evaluierung des Zellzustandes. Ein Anstieg der leberzellspezifischen Enzyme (Urea, AST, ALT, LDH) im Kulturmedium wäre mit einem erhöhten Leberzellschaden in der Kultur gleichzusetzen (81). Die Enzyme geraten ausschließlich bei erhöhter Membranpermeabilität, durch Zellzerfall in größeren Mengen ins Kulturmedium.

Die Ergebnisse (s. 3.3.2) zeigen, dass die gemessenen Parameter für Urea, AST, ALT und LDH sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur signifikant über den Kultivierungszeitraum abnehmen. Es ist anzunehmen, dass die an Tag 2 gemessenen höheren Werte durch den Zellstress während des Isolationsprozesses bedingt sind und den daraus entstandenen Zellschaden widerspiegeln. Die Messwerte sinken allerdings über die folgenden 2 Tage. Das spricht dafür, dass die Hc in Mono- und Kokultur von guter Viabilität sind und sich gut kultivieren lassen, was für die potentielle Repopularisierung eines Spenderorgans von größter Wichtigkeit ist. Entgegen der beschriebenen Annahme des positiven Einflusses der Vorläuferfraktion auf die primären adulten Hepatocyten (50), konnte ein solcher Effekt in den Zellkulturversuchen nicht beobachtet werden. Die gemessenen Werte in den Kokulturen für Urea, AST, ALT und LDH liegen sogar zu jedem Messzeitpunkt geringfügig über denen der Monokultur. Dies könnte für einen höheren Zellschaden in den Kokulturen sprechen. Die Unterschiede sind jedoch nur marginal und nicht signifikant. Es ist möglich, dass ein längerer Kultivierungszeitraum einen besseren Aufschluss über den Effekt von Vorläuferzellen auf adulte primäre Hepatocyten geben würde. So wurden beispielsweise von No et al. Daten publiziert, die zeigen, dass Hepatocyten in einer Kokultur mit Vorläuferzellen eine höhere metabolische Aktivität aufweisen als Hepatocyten in Monokultur (82). Es scheint außerdem sinnvoll in folgenden Versuchen weitere Eigenschaften in den verschiedenen Kulturen zu beurteilen.

So wäre es z.B. denkbar, die Fraktion proliferierender Hc in Mono- und Kokultur mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen, oder die Zytokinexpression zu messen, um pro-, bzw. antiinflammatorische Effekte der Kokultur detaillierter zu erfassen. Die grundlegenden

Ergebnisse aus den Kulturversuchen waren jedoch ausreichend um im Rattenmodell fortzufahren.

4.2.2 Bewertung der Y-Chromosomendetektion mittels FisH und qPCR

Um den Erfolg der postulierten Repopularisierung sowie deren Ausmaß im transplantierten Spenderorgan zu überprüfen, sollten 2 verschiedene Methoden etabliert und hinsichtlich ihrer Durchführbarkeit und Ergebnisse innerhalb des Projekts verglichen werden. Diese Methoden dienen zur spezifischen Detektion der Y-Chromosomen der Lew-m Spenderzellen in der weiblichen Spenderleber der DA-f. Es handelte sich hierbei um die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FisH) eines Y-Chromosomen-spezifischen DNA-Abschnitts und die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) zur Bestimmung des Y-Chromosomen-spezifischen SRY-Gens.

Bewertung der FisH

Für den Nachweis der syngen transplantierten Zellen mittels FisH wurden pro Versuchsgruppe jeweils 4 Tiere in die Analysen eingeschlossen. In jedem dieser Tiere konnten die syngen Spenderzellen der Lew-m nachgewiesen werden (s. 3.5.1). Die Funktion der Methode selbst wurde hierbei durch Mitführung von Positiv- (Lebergewebe einer männlichen Ratte ohne Behandlung) und Negativkontrollen (Lebergewebe einer weiblichen Ratte ohne Behandlung, Kontrolltiere KA-KD) überprüft. Die Einzeltiere in den jeweiligen Gruppen wurden untereinander hinsichtlich der FisH-Ergebnisse verglichen. Es zeigte sich dabei, dass sich die Mittelwerte Y-positiver Kerne und damit männlicher Spenderzellen je Tier innerhalb der Gruppen nicht signifikant unterscheiden (s. Abb. 12). Der Vergleich der Gruppenmittelwerte Y-positiver Kerne (MW Y) hingegen zeigte signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (s. Abb. 13).

Eine Verfolgung der Repopularisierung im Einzeltier war in unserem Versuchsaufbau nicht möglich. Die Homogenität der MW Y innerhalb der Gruppen weist in Verbindung mit den MW Y der Versuchsgruppen unterschiedlicher Finalisierungszeitpunkte allerdings auf einen charakteristischen Repopularisierungsverlauf im untersuchten Tiermodell hin. Während zunächst ein signifikanter Abfall des prozentualen Anteils männlicher Zellen während der ersten 30 Tage zu erkennen ist, liegt der Anteil FisH-positiver Zellen in Gruppe D wieder deutlich höher.

Dies weist auf eine erneute Zunahme der männlichen Spenderzellen im Gewebe und damit auf eine beginnende Repopularisierung des Spenderorgans durch die transplantierten Hepatocyten und Vorläuferzellen zwischen dem 30. und dem 90. Tag nach Transplantation hin. Die Anzahl der Spenderzellen im Spenderorgan über den Zeitverlauf scheint sich zunächst zu vermindern.

Dies wurde durch Ergebnisse der Gruppen A-C deutlich. Möglicherweise wird der initial hohe prozentuale Anteil an männlichen Spenderzellen nach 8 Tagen durch im Transplantationsverlauf zu stark geschädigter Hepatocyten, eine nicht ausreichend hohe Viabilität oder/und weitere mittransplantierte Zellarten (z.B. Leukozyten) bedingt. Vorstellbar wäre, dass diese Zellen nach der Transplantation durch immunologische Prozesse (z.B. Makrophagen) des Empfängertieres abgebaut werden oder aus der Leber emigrieren, wodurch es zu der Abnahme des MW Y kommt. Diese Ergebnisse zeigen, dass selbst bei einer initial mäßigen Viabilität der Zellen zum Transplantationszeitpunkt eine Repopularisierung des Spenderorgans erreicht werden kann. Hiermit konnte durch die Ergebnisse in der FisH die postulierte Grundaussage des Projekts scheinbar bestätigt werden. Um diesen Fakt zusätzlich zu verifizieren und zur erweiterte Beurteilung der Repopularisierung des Spenderorgans, wurde die qPCR als Vergleichsmethode etabliert.

Bewertung der qPCR

Über die qPCR konnte das, auf den Y-Chromosomen liegende SRY-Gen detektiert und quantifiziert werden. Mit Hilfe einer Standardkurve konnte so der prozentuale Anteil an männlichen Zellen im weiblichen Gewebe ermittelt werden (s.3.6). Für die Auswertung wurden in den Gruppen A und B jeweils 4 Tiere und in den Gruppen C und D jeweils 5 Tiere eingeschlossen. Das SRY-Gen konnte in dem Lebergewebe aller zelltransplantierten Tiere detektiert werden. Dies zeigt, dass sich in den transplantierten weiblichen Lebern (DA-f) aller weiblichen Versuchstiere (Lew-f) männliche Spenderzellen (Lew-m) befanden. Wie bereits in der FisH, wurden die Werte der Tiere innerhalb der spezifischen Gruppen sowie die Gruppenmittelwerte untereinander verglichen. Für die gruppeninterne Auswertung zeigte sich, dass sich der prozentuale Anteil SRY-positiver Kerne und damit an männlichen Zellen im Gewebe zwischen wenigen Tieren signifikant unterschied. Trotz der größeren Inhomogenität der Ergebnisse innerhalb der Versuchsgruppen im Vergleich zu den FisH-Ergebnissen, lässt sich auch in der qPCR ein Trend erkennen. Wie bei den Ergebnissen der FisH-Analyse sprechen der starke Anstieg des Anteils männlicher Spenderzellen zwischen der Gruppe C und der Gruppe D für eine erfolgreiche Repopularisierung.

Zusätzlich spricht auch die qPCR-Auswertung dafür, dass eine deutliche Zunahme der Repopularisierung zwischen dem 30. und 90. Tag nach LTx und kLZTx liegt. Die qPCR unterstreicht dadurch noch die Aussage der FisH. Die Repopularisierung eines allogenen Spenderorgans mit autologen adulten Hepatocyten und Vorläuferzellen im Rattenmodell konnte somit erfolgreich bewiesen werden.

Vergleich des Nutzen von FisH und qPCR zur Repopularisierungsanalyse

Die Ergebnisse (s. 3.5, 3.6) zeigten, dass der prozentuale Anteil männlicher Spenderzellen im weiblichen Spenderorgan in der Gruppe D höher ist als er in den Gruppen A, B und C. Für die qPCR ist der Unterschied von Gruppe D zur Gruppe A signifikant ($p < 0,01$). Bei der FisH ist der Anteil an Y-positiven Zellen in Gruppe D signifikant größer ($p < 0,05$) als der Anteil in Gruppe C.

Die Daten beider Methoden zeigen zum einen, dass eine Repopularisierung des weiblichen Spenderorgans mit männlichen Spenderzellen stattgefunden hat. Zum anderen zeigen die Ergebnisse, dass die tatsächliche Repopularisierung erst zwischen dem 30. und 90. Tag nach LTx und kLZTx zu beginnen scheint, da eine Zunahme des Anteils männlicher Spenderzellen in der Leber erst nach dem 30. Tag mit beiden Methoden nachzuweisen ist. Es ist bekannt, dass über 70% aller transplantierten Hepatocyten in den ersten 24-48h nach Leberzelltransplantation durch immunologische Prozesse zerstört werden (83). Hierzu tragen unter anderem Kupffer-Zellen bei. Diese Zellen werden durch eine Kalt-Ischämie, wie sie während der LTx vorkommt verstärkt aktiviert und bauen sogar syngene Zellen ab (84, 85). Es wäre daher möglich, dass eine erhöhte Anzahl an Kupffer-Zellen, bestehend aus Kupffer-Zellen in der allogenen Transplantationsleber und mittransplantierten syngen Kupffer-Zellen, zu einem verstärkten Abbau der transplantierten Zellen geführt hat. Hinzu können weitere Ursachen kommen (Transplantationsstress, Zellviabilität, weitere mittransplantierte Zellen), die zu dem späteren tatsächlichen Beginn der Repopularisierung geführt haben.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sowohl die FisH von Y-Chromosomen als auch die qPCR von SRY erfolgreich etabliert werden konnten. Sowohl die FisH als auch die qPCR sind in der Lage, über den spezifischen MW Y und MW SRY, die Repopularisierung qualitativ nachzuweisen.

Wie in 3.5 und 3.6 jedoch zu sehen ist, unterscheiden sich die quantitativen Ergebnisse beider Methoden teils sehr stark. Ein Vergleich der Mittelwerte der gruppenübergreifenden Analysen beider Methoden (MW Y, MW SRY) macht dies besonders deutlich (s. Abb. 13, 15).

In den Gruppen A, B und C liegen alle ermittelten Werte für den prozentualen Anteil an syngen männlichen Spenderzellen in der FisH-Analyse deutlich über denen der qPCR-Analyse. Die Ergebnisse der Gruppe D unterscheiden sich in beiden Methoden jedoch nicht signifikant, was den Repopularisierungserfolg unterstreicht.

Die Ergebnisse der FisH Methode ergaben sich aus den manuellen Zählungen der positiv gefärbten Zellkerne im Verhältnis zu allen Zellkernen in den 6 verschiedenen Arealen je Schnitt. Die Bewertung der Leberareale ist daher trotz aller Standardisierungsbemühungen eine subjektiv

beeinflusste Methode. Eine Überbewertung potentiell positiv gefärbter Strukturen kann daher nicht vollends ausgeschlossen werden. Des Weiteren umfasst die Analyse von 2 Schnitten je Läppchen, mit einer Schnitttiefe von je 2µm und mit einer Anzahl von 3-6 Läppchen pro Tier letztlich nur einen kleinen Teil der Gesamtleber. Des Weiteren konnten Timm et al. zeigen, dass Leberzellen die zur Transplantation über den Portaltrakt appliziert wurden, sich sehr inhomogen im Lebergewebe verteilen (86). Eine Ermittlung des tatsächlichen Ist-Zustandes für das gesamte Lebergewebe eines Tieres ist demnach mit der FisH-Methode nicht möglich. Trotz dessen zeigte der Vergleich zwischen den ermittelten prozentualen Ergebnissen pro Tier in einer Gruppe nur sehr geringe Abweichungen (s. 3.5), was durch eine hohe Anzahl an ausgezählten Arealen/Tier begründet ist und auf eine vergleichbar homogene Validierung der Methode hindeutet.

Die Daten der qPCR bilden im Vergleich dazu einen viel größeren Anteil des Lebergewebes ab. Hier wurden für die Analyse insgesamt zwischen 10 bis 20 Schnitte mit einem Durchmesser von 5µm pro Läppchen eingeschlossen. Aus diesen Schnitten wurde die gesamte DNA isoliert und zur Auswertung herangezogen, was die Aussagekraft der qPCR-Ergebnisse gegenüber denen der FisH deutlich erhöht. Dennoch weist auch die qPCR zum Nachweis von DNA aus paraffinisierten Proben potentielle Schwachstellen auf. Durch die Fixierung des Probenmaterials mittels Formalin kann es u.U. zu Veränderungen an der DNA kommen. Hierzu zählen unter anderem eine potentielle Denaturierung sowie Fragmentierung von DNA-Proteinen und die mögliche Bildung von neuen Vernetzungen zwischen der DNA und anderen Proteinen (87). Eine Isolierung von teilweise geschädigter und/oder fragmentierter DNA wurde in dieser Studie durch die Verwendung eines gDNA Isolierungskits (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit) minimiert, das speziell für formalin-fixiertes Gewebe vorgesehen ist. Trotz dessen ist es nicht auszuschließen, das ggf. ein geringer Anteil an DNA verloren gegangen sein könnte. Somit könnte der gemessene Anteil SRY-positiver Kerne möglicherweise verzerrt worden sein und vom tatsächlichen Ist-Anteil abweichen. Dies kann zudem eine Erklärung für die stärker voneinander abweichenden Ergebnisse der Einzeltiere bei der qPCR im Vergleich zu denen der FisH-Analyse sein.

Trotz der potentiellen Fehlerquellen beider Methoden ist es durchaus wahrscheinlich, dass sich der tatsächliche prozentuale Ist-Wert männlicher Spenderzellen in der weiblichen Leber zwischen den ermittelten Werten von FisH und qPCR befindet.

Durch die, im Vergleich zur qPCR, deutlich aufwändigere FisH-Methode und die subjektive Analyse der zudem geringeren Gesamtlebermasse, ist eine Vermeidung von Fehlerquellen nur schwer umsetzbar. Hingegen bieten sich Ansatzpunkte, um in folgenden Arbeiten des Projektes Fehlerquellen in der qPCR noch weiter zu minimieren, um noch genauere Daten hinsichtlich des

Repopularisierungsverlaufs nach LTx und kLZTx zu generieren. Hierfür ist es wichtig, die oben beschriebenen Schädigungen der DNA gänzlich zu vermeiden oder zumindest so gering wie möglich zu halten. Es existieren Möglichkeiten, um die entnommenen Lebertransplantate für weitere Analysen zu fixieren und zu konservieren ohne dabei auf Formalin und Paraffinierung zurückgreifen zu müssen. Miething et al. beschrieben beispielsweise, dass es möglich ist humane genomische DNA aus Leberproben zu detektieren die mittels Glutaraldehyd oder Carnoy'scher Lösung bis zu einem Jahr fixiert wurden (87). Eine weitere Möglichkeit wäre es, die entnommenen Transplantate mittels flüssigen Stickstoffs zu schockgefrieren und anschließend bis zur Analyse bei -80 °C zu asservieren.

Es erscheint außerdem sinnvoll, in weiteren Arbeiten zusätzliche Versuchsgruppen mit längeren Standzeiten (z.B. 180d, 360d post LTx + kLZTx) zu etablieren, um den weiteren Verlauf der Repopularisierung der allogenen Spenderleber mit syngenem Spenderzellen beurteilen zu können. Unter Anwendung dieser Verbesserungen sollte es möglich sein, mit Hilfe der SRY-qPCR sehr valide Aussagen über den Langzeit-Repopularisierungsverlauf nach LTx und kLZTx zu erhalten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die gemeinsame Transplantation von syngenem Hepatocyten und hepatischen Vorläufern in ein allogenes Lebertransplantat erstmals erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die Repopularisierung dieses allogenen Organs ist mit einer beginnenden Autologisierung gleichzusetzen. Damit konnten erste Voraussetzungen für eine Toleranzentwicklung von Organempfängern gegenüber ihren Spenderorganen erarbeitet werden, die das Ziel des der Arbeit angehörenden Projektes ist.

Literaturverzeichnis

1. Löffler G. Biochemie und Pathobiochemie mit 192 Tabellen ; [+ online specials]. 8., vollst. neu bearb. Aufl. ed. Heidelberg: Springer; 2007.
2. Starzl TE, Marchioro TL, Vonkaulla KN, Hermann G, Brittain RS, Waddell WR. Homotransplantation of the Liver in Humans. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1963;117:659-76.
3. Calne RY, Williams R. Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *British medical journal*. 1968;4(5630):535-40.
4. Gutgemann A, Schriefers KH, Esser G, Lee TS, Paquet KJ, Kaufer C. [Report of experience with homologous liver transplantation]. *Dtsch Med Wochenschr*. 1969;94(35):1713-7. doi: 10.1055/s-0028-1110331.
5. McMaster P, Herbertson B, Cusick C, Calne RY, Williams R. Biliary sludging following liver transplantation in man. *Transplantation*. 1978;25(2):56-62.
6. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation (1). *The New England journal of medicine*. 1989;321(15):1014-22. doi: 10.1056/NEJM198910123211505.
7. Starzl TE, Demetris AJ, Van Thiel D. Liver transplantation (2). *The New England journal of medicine*. 1989;321(16):1092-9. doi: 10.1056/NEJM198910193211606.
8. Calne RY. A new technique for biliary drainage in orthotopic liver transplantation utilizing the gall bladder as a pedicle graft conduit between the donor and recipient common bile ducts. *Annals of surgery*. 1976;184(5):605-9.
9. Halff G, Todo S, Hall R, Starzl TE. Late complications with gallbladder conduit biliary reconstruction after liver transplantation. *Transplantation*. 1989;48(3):537-9.
10. Neuhaus P, Platz KP. Liver transplantation: newer surgical approaches. *Bailliere's clinical gastroenterology*. 1994;8(3):481-93.
11. Shaw BW, Jr., Martin DJ, Marquez JM, Kang YG, Bugbee AC, Jr., Iwatsuki S, et al. Venous bypass in clinical liver transplantation. *Annals of surgery*. 1984;200(4):524-34.
12. Griffith BP, Shaw BW, Jr., Hardesty RL, Iwatsuki S, Bahnson HT, Starzl TE. Veno-venous bypass without systemic anticoagulation for transplantation of the human liver. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1985;160(3):270-2.
13. Kalayoglu M, Stratta RJ, Sollinger HW, Hoffmann RM, D'Alessandro AM, Pirsch JD, et al. Clinical results in liver transplantation using UW solution for extended preservation. *Transplantation proceedings*. 1989;21(1 Pt 2):1342-3.
14. Cofer JB, Klintmalm GB, Howard TK, Morris CV, Husberg BS, Goldstein RM, et al. A comparison of UW with Eurocollins preservation solution in liver transplantation. *Transplantation*. 1990;49(6):1088-93.

15. Bismuth H, Morino M, Castaing D, Gillon MC, Descorps Declere A, Saliba F, et al. Emergency orthotopic liver transplantation in two patients using one donor liver. *The British journal of surgery*. 1989;76(7):722-4.
16. Esquivel CO, Nakazato P, Cox K, Concepcion W, Berquist W, Russell TR. The impact of liver reductions in pediatric liver transplantation. *Arch Surg*. 1991;126(10):1278-85; discussion 85-6.
17. Broelsch CE, Emond JC, Whittington PF, Thistlethwaite JR, Baker AL, Lichtor JL. Application of reduced-size liver transplants as split grafts, auxiliary orthotopic grafts, and living related segmental transplants. *Annals of surgery*. 1990;212(3):368-75; discussion 75-7.
18. Broelsch CE, Malago M, Testa G, Valentin Gamazo C. Living donor liver transplantation in adults: outcome in Europe. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2000;6(6 Suppl 2):S64-5. doi: 10.1053/jlts.2000.19015.
19. Broelsch Ch E, Frilling A, Nadalin S, Valentin GC, Kuhl H, Gerken G, et al. [Living organ donor transplantation--the German experience in comparison to others]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 2003;74(6):510-22. doi: 10.1007/s00104-003-0685-8.
20. Renz JF, Yersiz H, Reichert PR, Hisatake GM, Farmer DG, Emond JC, et al. Split-liver transplantation: a review. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(11):1323-35.
21. Bechstein WO, Wiens M, Raakow R, Keck H, Blumhardt G, Neuhaus P. [Special "supportive" therapy (nutrition, control of infection, intensive care) in transplantation medicine]. *Zentralblatt für Chirurgie*. 1993;118(8):477-81.
22. Rossaint R, Slama K, Jaeger M, Konrad M, Pappert D, Bechstein W, et al. Fluid restriction and early extubation for successful liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1990;22(4):1533-4.
23. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology*. 1982;2(5):614-36.
24. Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, et al. Cyclosporin A initially as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases, and 2 livers. *Lancet*. 1979;2(8151):1033-6.
25. Lüllmann H, Mohr K, Hein L. *Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen ; ein Lehrbuch für Studierende der Medizin, der Pharmazie und der Biowissenschaften, eine Informationsquelle für Ärzte, Apotheker und Gesundheitspolitiker ; 130 Tabellen. 17., vollst. überarb. Aufl. ed. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2010.*
26. Liver transplantation. National Institutes of Health Consensus Development. National Institutes of Health consensus development conference summary. 1983;4(7):15 p.

27. Goto T, Kino T, Hatanaka H, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, et al. Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. Transplantation proceedings. 1987;19(5 Suppl 6):4-8.
28. Kino T, Hatanaka H, Miyata S, Inamura N, Nishiyama M, Yajima T, et al. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. The Journal of antibiotics. 1987;40(9):1256-65.
29. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. The New England journal of medicine. 1994;331(17):1110-5. doi: 10.1056/NEJM199410273311702.
30. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. Lancet. 1994;344(8920):423-8.
31. Wiesner R, Rabkin J, Klintmalm G, McDiarmid S, Langnas A, Punch J, et al. A randomized double-blind comparative study of mycophenolate mofetil and azathioprine in combination with cyclosporine and corticosteroids in primary liver transplant recipients. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2001;7(5):442-50. doi: 10.1053/jlts.2001.23356.
32. Kelly PA, Gruber SA, Behbod F, Kahan BD. Sirolimus, a new, potent immunosuppressive agent. Pharmacotherapy. 1997;17(6):1148-56.
33. Sehgal SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. Therapeutic drug monitoring. 1995;17(6):660-5.
34. Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). Journal of hepatology. 2012;57(3):675-88. doi: 10.1016/j.jhep.2012.04.015.
35. Tisone G, Orlando G, Angelico M. Operational tolerance in clinical liver transplantation: emerging developments. Transplant immunology. 2007;17(2):108-13. doi: 10.1016/j.trim.2006.09.021.
36. Monaco AP. The beginning of clinical tolerance in solid organ allografts. Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation. 2004;2(1):153-61.
37. Wang C, Sun J, Sheil AG, McCaughan GW, Bishop GA. A short course of methylprednisolone immunosuppression inhibits both rejection and spontaneous acceptance of rat liver allografts. Transplantation. 2001;72(1):44-51.
38. Siemionow M, Nasir S. Chimerism and bone marrow based therapies in transplantation. Microsurgery. 2007;27(5):510-21. doi: 10.1002/micr.20395.
39. Pons JA, Ramirez P, Revilla-Nuin B, Pascual D, Baroja-Mazo A, Robles R, et al. Immunosuppression withdrawal improves long-term metabolic parameters, cardiovascular risk

- factors and renal function in liver transplant patients. *Clinical transplantation*. 2009;23(3):329-36. doi: 10.1111/j.1399-0012.2008.00944.x.
40. Laurson J, Selden C, Clements M, Mavri-Damelin D, Coward S, Lowdell M, et al. Putative human liver progenitor cells in explanted liver. *Cells, tissues, organs*. 2007;186(3):180-91. doi: 10.1159/000106360.
 41. Gerlach JC, Mutig K, Sauer IM, Schrade P, Efimova E, Mieder T, et al. Use of primary human liver cells originating from discarded grafts in a bioreactor for liver support therapy and the prospects of culturing adult liver stem cells in bioreactors: a morphologic study. *Transplantation*. 2003;76(5):781-6. doi: 10.1097/01.TP.0000083319.36931.32.
 42. Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*. 2003;120(1):117-30.
 43. Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M, et al. Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *The American journal of pathology*. 2009;175(4):1483-92. doi: 10.2353/ajpath.2009.090117.
 44. Newsome PN, Hussain MA, Theise ND. Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology. *Current topics in developmental biology*. 2004;61:1-28. doi: 10.1016/S0070-2153(04)61001-5.
 45. Shafritz DA, Oertel M, Menthen A, Nierhoff D, Dabeva MD. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S89-98. doi: 10.1002/hep.21047.
 46. Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1782(2):61-74. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.12.004.
 47. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer research*. 1989;49(6):1541-7.
 48. Lowes KN, Croager EJ, Olynyk JK, Abraham LJ, Yeoh GC. Oval cell-mediated liver regeneration: Role of cytokines and growth factors. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2003;18(1):4-12.
 49. Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *The American journal of pathology*. 1999;154(2):537-41. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65299-6.
 50. Matsusaka S, Toyosaka A, Nakasho K, Tsujimura T, Sugihara A, Takanashi T, et al. The role of oval cells in rat hepatocyte transplantation. *Transplantation*. 2000;70(3):441-6.
 51. Joshi M, P BP, He Z, Holgersson J, Olausson M, Sumitran-Holgersson S. Fetal liver-derived mesenchymal stromal cells augment engraftment of transplanted hepatocytes. *Cytherapy*. 2012;14(6):657-69. doi: 10.3109/14653249.2012.663526.

52. Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD. Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology*. 2008;47(2):636-47. doi: 10.1002/hep.22047.
53. Shupe TD, Piscaglia AC, Oh SH, Gasbarrini A, Petersen BE. Isolation and characterization of hepatic stem cells, or "oval cells," from rat livers. *Methods Mol Biol*. 2009;482:387-405. doi: 10.1007/978-1-59745-060-7_24.
54. Jelnes P, Santoni-Rugiu E, Rasmussen M, Friis SL, Nielsen JH, Tygstrup N, et al. Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration. *Hepatology*. 2007;45(6):1462-70. doi: 10.1002/hep.21569.
55. He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell proliferation*. 2004;37(2):177-87. doi: 10.1111/j.1365-2184.2004.00293.x.
56. Gassel HJ, Otto C, Gassel AM, Meyer D, Steger U, Timmermann W, et al. Tolerance of rat liver allografts induced by short-term selective immunosuppression combining monoclonal antibodies directed against CD25 and CD54 with subtherapeutic cyclosporine. *Transplantation*. 2000;69(6):1058-67.
57. Zimmermann FA, Davies HS, Knoll PP, Gokel JM, Schmidt T. Orthotopic liver allografts in the rat. The influence of strain combination on the fate of the graft. *Transplantation*. 1984;37(4):406-10.
58. Schoental R. Hepatotoxic action of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids in relation to their structure. *Nature*. 1957;179(4555):361-3.
59. Schoental R, Head MA. Progression of liver lesions produced in rats by temporary treatment with pyrrolizidine (senecio) alkaloids, and the effects of betaine and high casein diet. *British journal of cancer*. 1957;11(4):535-44.
60. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, 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):319-29. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65574-5.
61. Dabeva MD, Laconi E, Oren R, Petkov PM, Hurston E, Shafritz DA. Liver regeneration and alpha-fetoprotein messenger RNA expression in the retrorsine model for hepatocyte transplantation. *Cancer research*. 1998;58(24):5825-34.
62. Alison MR, Golding M, Sarraf CE, Edwards RJ, Lalani EN. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology*. 1996;110(4):1182-90.
63. Yu CH, Chang MH, Chien CS, Chen YH, Chang MF, Chen HL. Hepatocyte transplantation and the differentiation fate of host oval cells in acute severe hepatic injury. *Cell transplantation*. 2010;19(2):231-43. doi: 10.3727/096368909X479848.

64. Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology*. 1998;27(4):1030-8. doi: 10.1002/hep.510270419.
65. Yin L, Lynch D, Sell S. Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol. *Journal of hepatology*. 1999;31(3):497-507.
66. Darwiche H, Oh SH, Steiger-Luther NC, Williams JM, Pintilie DG, Shupe TD, et al. Inhibition of Notch signaling affects hepatic oval cell response in rat model of 2AAF-PH. *Hepatic medicine : evidence and research*. 2011;3:89-98. doi: 10.2147/HMER.S12368.
67. Batusic DS, von Bargen A, Blaschke S, Dudas J, Ramadori G. Different physiology of interferon-alpha/-gamma in models of liver regeneration in the rat. *Histochemistry and cell biology*. 2011;136(2):131-44. doi: 10.1007/s00418-011-0838-7.
68. Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, et al. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *The American journal of pathology*. 2003;163(1):3-9. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63624-3.
69. Sanchez A, Factor VM, Schroeder IS, Nagy P, Thorgeirsson SS. Activation of NF-kappaB and STAT3 in rat oval cells during 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Hepatology*. 2004;39(2):376-85. doi: 10.1002/hep.20040.
70. Neufeld DS. Isolation of rat liver hepatocytes. *Methods Mol Biol*. 1997;75:145-51. doi: 10.1385/0-89603-441-0:145.
71. Gupta S, Lee CD, Vemuru RP, Bhargava KK. 111Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology*. 1994;19(3):750-7.
72. Markus PM, Koenig S, Krause P, Becker H. Selective intraportal transplantation of DiI-marked isolated rat hepatocytes. *Cell transplantation*. 1997;6(5):455-62.
73. Mosahebi A, Woodward B, Wiberg M, Martin R, Terenghi G. Retroviral labeling of Schwann cells: in vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration. *Glia*. 2001;34(1):8-17.
74. Malhi H, Gupta S. Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *Journal of hepatobiliary-pancreatic surgery*. 2001;8(1):40-50.
75. Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, Kimura A, Hakamata Y, Sato Y, et al. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;329(1):288-95. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.01.132.
76. Ausschuss für Anaesthesie AuS. Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. In: Gesellschaft für Versuchstierkunde SfLAS, Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz, editor. 2010.
77. Higgins GM AR. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. . *Arch Pathol Lab Med* 12:186-202.

78. Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2008;28(1):3-11. doi: 10.1111/j.1478-3231.2007.01628.x.
79. Lee S, Charters AC, 3rd, Orloff MJ. Simplified technic for orthotopic liver transplantation in the rat. *American journal of surgery*. 1975;130(1):38-40.
80. Ely D, Underwood A, Dunphy G, Boehme S, Turner M, Milsted A. Review of the Y chromosome, Sry and hypertension. *Steroids*. 2010;75(11):747-53. doi: 10.1016/j.steroids.2009.10.015.
81. Kardassis D, Busse B, Besseling A, Kraemer M, Puhl G, Spatkowski G, et al. Enzyme release in hybrid liver support systems: marker for quality prior to clinical application. *Transplantation proceedings*. 1999;31(1-2):668-9.
82. No da Y, Lee SA, Choi YY, Park D, Jang JY, Kim DS, et al. Functional 3D human primary hepatocyte spheroids made by co-culturing hepatocytes from partial hepatectomy specimens and human adipose-derived stem cells. *PloS one*. 2012;7(12):e50723. doi: 10.1371/journal.pone.0050723.
83. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, et al. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology*. 1999;29(2):509-19. doi: 10.1002/hep.510290213.
84. Lee LY, Kaizu T, Toyokawa H, Zhang M, Ross M, Stolz DB, et al. Carbon monoxide induces hypothermia tolerance in Kupffer cells and attenuates liver ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17(12):1457-66. doi: 10.1002/lt.22415.
85. Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology*. 2002;123(5):1677-85.
86. Timm F, Vollmar B. Heterogeneity of the intrahepatic portal venous blood flow: impact on hepatocyte transplantation. *Microvascular research*. 2013;86:34-41. doi: 10.1016/j.mvr.2012.11.008.
87. Miething F, Hering S, Hanschke B, Dressler J. Effect of fixation to the degradation of nuclear and mitochondrial DNA in different tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2006;54(3):371-4. doi: 10.1369/jhc.5B6726.2005.

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 Übersicht über Zeitpunkte einer partiellen Hepatektomie (PH) nach erfolgter 2AAF-Implantation und Tage der höchsten Ovalzellen (OC)-Detektion nach PH.
- Tab. 2 Übersicht über Finalisierungsgruppen nach kombinierter Transplantation (LTx + kLZTx) mit konstanter Immunsuppressionsapplikation zu verschiedenen Zeitpunkten post-LTx zur Untersuchung der Repopularisierung des allogenen Spenderorgans mit syngenen Zellen.
- Tab. 3 Anhepatische Phasen während der LTx sowie Zeitpunkte der kLZTx
- Tab. 4 Viabilitäten und Zellzahlen von Hc nach Easycoll, sowie die zur kLZTx verwendeten Anteile der Vorläuferfraktionen von den Isolierungen von Lew-m 1-8 und deren kLZTx-Empfänger
- Tab. 5 Mittelwerte und Standardfehler für Harnstoff (Urea), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) von primärer Hepatocyten-Monokultur (pHc) und primärer Hepatocyten-Vorläufer-Kokultur (pHcOc)
- Tab. 6 Mittelwerte Y-positiver Kerne (%), SD(%) und SEM(%) der Einzeltiere der Versuchsgruppen A-D
- Tab. 7 Mittelwerte SRY-positiver Kerne (%), SD(%) und SEM(%) der Einzeltiere der Versuchsgruppen A-D

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Entwicklung der Gesamtanzahl an Lebertransplantationen in Europa seit 1968 (nach: European Liver Transplant Register – Homepage; Evolution of LTs in Europe [Stand: 01.12.2014; <http://www.eltr.org/Evolution-of-LTs-in-Europe.html#>])
- Abb. 2 Grafische Zusammenfassung des Versuchsaufbaus
- Abb. 3 Schematischer Ablauf der Isolierung primärer adulter Hepatocyten und nicht-parenchymaler hepatischer Vorläufer aus Rattenlebern
- Abb. 4 Darstellung des Optiprep[®]-Dichtegradienten nach der Zentrifugation mit ausgebildeter Zellbande
- Abb. 5 Schematische Darstellung der FisH-Probenauswertung
- Abb. 6 Schematische Darstellung der y-Chromosomendetektion mittels qPCR für einen einfachen gDNA-Isolationsansatz
- Abb. 7 Mittelwerte (MW) mit Standardfehler (SEM) für [A] Harnstoff (Urea) in mg/dL, [B] Aspartat-Aminotransferase (AST) in U/L, [C] Alanin-Aminotransferase (ALT) in U/L und [D] Lactat-Dehydrogenase (LDH) in U/L von primärer Hepatocyten-Monokultur (pHc) und primärer Hepatocyten-Vorläuferzellen-Kokultur (pHcOc) über die Zeit (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001)
- Abb. 8 Verifizierung des Retrorsin-Modells anhand immunhistologischer Proliferationsfärbungen (PCNA) von Leberschnitten bei DA-Tieren am Tag (A) 0, (B) 39, (C) 45, (D) 50 nach der ersten Retrorsin-Injektion. Roter Pfeil=PCNA positiver Zellkern
- Abb. 9 Immunhistologische Proliferationsfärbung (PCNA) der Rattenleber zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2-AAF und PH. PCNA-Färbung 6 Tage post 2-AAF (A) ohne PH und (B) 7 Tage, (C) 9 Tage, (D) 11 Tage und (E) 14 Tage nach PH. Roter Pfeil=PCNA positiver Zellkern
- Abb. 10 Immunhistologische OV-6-Färbung hepatischer Vorläuferzellen (Oc) zu verschiedenen Zeitpunkten nach 2-AAF-Implantation und PH in der Rattenleber.

OV-6-Färbung (A) nativ, und 6 Tage nach 2-AAF (B) ohne PH, (C) 7 Tage, (D) 9 Tage, (E) 11 Tage und (F) 14 Tage nach PH. Roter Pfeil = OV-6 positive Zelle

- Abb. 11 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zur Visualisierung der Y-Chromosomen transplantiertes, männlicher Zellen am Beispiel von Tier D5 der Gruppe D, 90 Tage nach kombinierter LTx kLZTx, blau= Zellkerne (DAPI-Färbung), rot=Y-Chromosomen (FisH-Färbung). (Maßstab: 50µm)
- Abb. 12 Darstellung der Mittelwerte Y-positiver Kerne pro Tier (in % ± SEM) für [A] der Tiere A1, A2, A3 und A4, [B] der Tiere B1, B2, B3 und B5, [C] der Tiere C1, C2, C3, C4 und C5 und [D] der Tiere D2, D3, D4 und D5 ermittelt durch FisH
- Abb. 13 Darstellung der Mittelwerte Y-positiver Kerne (in % ± SEM) der Finalisierungsgruppen 8 (A), 15 (B), 30 (C) und 90 (D) Tage nach LTx und kLZTx ermittelt durch FisH (*p < 0,05)
- Abb. 14 Darstellung der Mittelwerte SRY-positiver Kerne pro Tier (in % ± SEM) für [A] der Tiere A1, A2, A3 und A4, [B] der Tiere B1, B2, B3 und B4, [C] der Tiere C1, C2, C3, C4 und C5 und [D] der Tiere D1, D2, D3, D4 und D5 ermittelt durch qPCR (*p < 0,05, **p < 0,01)
- Abb. 15 Darstellung der Mittelwerte SRY-positiver Kerne (in % ± SEM) der Finalisierungsgruppen 8 (A), 15 (B), 30 (C) und 90 (D) Tage nach LTx und kLZTx (**p < 0,01) ermittelt durch qPCR

Materialliste

Versuchstiere

Leberzellspendertier: Lew-m (Lew Han™ Hsd)	<i>Harlan-Winkelmann, Borch</i>
Empfängertier: Lew-f (Lew Han™ Hsd)	<i>Harlan-Winkelmann, Borch</i>
Leberspendertier: DA-f (DA RT1av1)	<i>Harlan-Winkelmann, Borch</i>

Medikamente und Chemikalien zur Applikation

2-AAF-Pellet (35 mg/ pellet, 21-day release)	<i>Innovative Research of America, USA</i>
Carprofen (Rimadyl® ad us. vet., Injektionslösung)	<i>Pfizer, Berlin</i>
Cyclosporin A (Sandimmun® 50 mg/ml)	<i>Novartis, Nürnberg</i>
Heparin (Heparin-Natrium-25000-ratiopharm® Inj.)	<i>Ratiopharm GmbH, Ulm</i>
Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm® Inj.)	<i>Ratiopharm GmbH, Ulm</i>
Retrorsin-Pulver	<i>Sigma-Aldrich Corporation, USA</i>

Chemikalien, Lösungen und Enzymlösungen

2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	<i>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
Alkohollösungen (vergällte Ethanol-Lösung)	<i>Herbeta Arzneimittel, Berlin</i>
Aqua dest.	-
Calciumchlorid (CaCl ₂)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Collagenase P	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
D-Glucose	<i>Sigma-Aldrich Corporation, USA</i>
DAPI-Lösung	<i>Vector Laboratories Inc., USA</i>
DMEM-Medium low glucose	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching</i>

DNase I	<i>Roche Diagnostics GmbH, Mannheim</i>
Dulbecco`s 1x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung ohne Calcium und Magnesium)	<i>PAA Laboratories GmbH, Pasching</i>
Easycoll Seperating Solution (1,124g/ml)	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Eindeckmittel (Aquatex [®])	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Epidermal Growth Factor (EGF)	<i>Sigma-Aldrich Corporation, USA</i>
Ethylenglycol bis- [2-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraessigsäure) (EGTA)	<i>Sigma-Aldrich Corporation, USA</i>
Formaldehyd (37%ig)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Formalin-Lösung (4 %ig)	<i>Herbeta Arzneimittel, Berlin</i>
Fötales Bovines Serum (FBS Superior)	<i>Biochrom AG, Berlin</i>
Dexamethason (Fortecortin [®] Inject)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Glucagon (GlucaGen [®])	<i>Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz</i>
Insulin (Humaninsulin [®] Normal 100)	<i>Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg</i>
Kaliumchlorid (KCl)	<i>Merck KGaA, Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	<i>Sigma-Aldrich Corporation, USA</i>
Natriumacetat-Dihydrat	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Natriumchlorid (NaCl)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Natriumchlorid 0,9% (1L Spüllösung, Plastipur [®])	<i>Fresenius, Bad Homburg v. d. H.</i>
Natriumhydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	<i>SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
Natriumhydroxid (NaOH)	<i>Sigma-Aldrich Corporation, USA</i>

Nonidet P-40	(Octyl-Phenoxyethoxyethanol)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Optiprep®	Density Gradient Medium (60% ig)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Paraffin		Sigma-Aldrich Corporation, USA
Penicillin/Streptomycin	lyophilisiert	Biochrom AG, Berlin
Pepsin	(aus Magenschleimhaut vom Schwein)	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Protease von Streptomyces	griseus	Sigma-Aldrich Corporation, USA
Proteinase K		Dako, Hamburg
Salzsäure-Lösung	1M (HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TBS	(Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung, 10-fach)	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan-Blau-Lösung		Sigma-Aldrich Corporation, USA
Xylol		Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Zitronensäure		Sigma-Aldrich Corporation, USA

Analytik

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit		Quiagen GmbH-Germany, Hilden
TaqMan® Gene Expression Assay for "SRY"		Applied Biosystems, U.S.A.
TaqMan® Gene Expression Master Mix		Applied Biosystems, U.S.A.

Immunhistochemie, Antikörper und Sonden

AFP-Primärantikörper	(Hase, polyklonal),	Abgent, U.K.
AJ1032a		
Anti-Rabbit, LSAB+System-HRP Kit,	K0679	Dako, Hamburg
APAAP-Komplex (Maus, monoklonal),	K0651	Dako, Hamburg
CK-18-Primärantikörper (Maus, monoklonal),	ab668	Abcam, U.K.

Eosin 1%ig, alkoholisch, 11503 *MORPHISTO®*
Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt a. M.

EpCam-Primärantikörper (Hase, monoklonal), *Abcam, U.K.*
 ab32392

Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom *ID Labs Biotechnology, U.K.*
 IDYE™556)

Fuchsin-Chromogen-Färbung, K0625 *Dako, Hamburg*

Hämatoxylin nach Mayer, A4840 *Applichem GmbH, Darmstadt*

Hybridisierungssonden (Mouse and Rat I *ID Labs Biotechnology, U.K.*
 Detect™ Chromosome Paint Probes)

OV-6 Primärantikörper (Maus, monoklonal), *SantaCruz, U.S.A.*
 sc-101863

Thy-1 Primärantikörper (Hase, monoklonal, *Abcam, U.K.*
 IgG), ab92574

Geräte

Blockthermostat, digital *VWR International GmbH,*
 Darmstadt

Einbettssystem (Leica EG 1160) *Leica Mikrosysteme Vertrieb*
GmbH, Wetzlar

Feinwaage (Sartorius AC121s) *Sartorius Stedim Biotech GmbH,*
 Göttingen

Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 40CFL) *Carl Zeiss AG, Oberkochen*

Heiz-/Rührplatte (RCT basic IKAMAG® safety *IKA®, Staufen*
 control)

NanoDrop ND 1000 (Fotometer) *NanoDrop Products, U.S.A.*

Objektträgerhalter (Dako REAL™ Slide Holder) *Dako, Hamburg*

Operations-Mikroskop *Leica WILD Heerbrugg*

Pipetten (Eppendorf Reference® 0,5-10µL, 10- *Eppendorf Vertrieb Deutschland*
 100µL, 100-1000µL) *GmbH, Wesseling-Berzdorf*

Pipettierhelfer (accu-jet® pro)	<i>Brand GmbH + Co. KG, Wertheim</i>
Rotationsmikrotom (Leica RM2255)	<i>Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar</i>
Schlauchpumpe TU	<i>Medorex, Nörten-Hardenberg</i>
Schüttler (PMR-30 Compact Fixed-Angle Platform Rocker)	<i>Grant Instruments (Cambridge) Ltd, U.K.</i>
StepOnePlus Real-Time PCR System	<i>Applied Biosystems, U.S.A.</i>
Sterilwerkbank (Cleanbench)	<i>Heraeus Instruments GmbH, Berlin</i>
Vortex-Mixer	<i>neoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH, Heidelberg</i>
Wasserbad (Julabo TW20)	<i>JULABO Labortechnik GmbH, Seelbach</i>
Zentrifuge (Multifuge® 3 SR)	<i>Heraeus Instruments GmbH, Berlin</i>

Verbrauchsmaterialien

6-Loch-Platte (BD Falcon™ 6-well Multiwell Plate)	<i>BD, Heidelberg</i>
96-Loch-Platte (BD Falcon™ 96-Well Assay Plate)	<i>BD, Heidelberg</i>
Einbettkassetten (Rotilabo®)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Flüssigkeitssterilfilter (Minisart®)	<i>Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen</i>
Flüssigkeitssterilfilter (Nalgene® MF75™ Series)	<i>Thermo Fisher Scientific, U.S.A.</i>
Heidelberger Verlängerung (75cm)	<i>Fresenius Kabi AG, Bad Homburg</i>
Konische Röhren (BD Falcon™ 15mL, 50mL)	<i>BD, Heidelberg</i>

Laborflaschen (VWR Borosilikatglas 3.3 VWR <i>International GmbH</i> , 500mL, 1L, 2L)	Darmstadt
Perfusorspritze (Original-Perfusor [®] Syringe B. <i>Braun Melsungen AG</i> , 50mL)	Melsungen
Pipetten (BD Falcon [™] Serologische Pipetten <i>BD</i> , Heidelberg 5mL, 10mL, 25mL)	
Pipetten (10µL, 200µL, 1000µL)	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
Reagiergefäße (2,0mL)	<i>Sarstedt</i> , Nümbrecht
Reagiergefäße, RNase-frei, 2mL (Ambion [®] <i>Life Technologies GmbH</i> , RNase-free Microfuge Tubes)	Darmstadt
Schlauchverbindungen (Combifix [®] Adapter)	<i>B. Braun Melsungen AG</i> , Melsungen
Zellkulturschale 100x20mm (BD Falcon [™] 100 mm Cell Culture Dish)	<i>BD</i> , Heidelberg
Zellsieb (BD Falcon [™] Zellsieb 40µm)	<i>BD</i> , Heidelberg

Lösungen und Medien

Leberzellisolierung

Stocklösungen

Alle Stocklösungen wurden steril filtriert und bis zum Verbrauchszeitpunkt bei 4°C in geschlossenen sterilen Schottflaschen gelagert. Die Stocklösungen wurden bei nicht Verbrauch nach spätestens 4 Wochen verworfen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

10x Leffert`s Puffer

Der Puffer wurde in 2L Schottflaschen angesetzt und auf pH=7,4 eingestellt.

- 100mM HEPES
- 30mM KCL
- 1,3M NaCl
- 10mM NaH₂PO₄
- 100mM D-Glucose
- Aqua dest. auf 2L auffüllen

10x EGTA Puffer

Der Puffer wurde in 1L Schottflaschen angesetzt und auf pH=7,4 eingestellt.

- 1,9g EGTA in 100mL 10x Leffert`s und 800mL Aqua dest.
- Zugabe von 10M NaOH-Lösung bis zur vollständigen Lösung von EGTA
- Aqua dest. auf 1L auffüllen

100x Calciumchlorid (CaCl₂) Lösung (2,79%ig)

Die Lösung wurde in 1L Schottflaschen angesetzt und auf pH=7,4 eingestellt.

- 27,9g CaCl₂
- Aqua dest. auf 1L auffüllen

Gebrauchslösungen

Alle Puffer wurden am Vorabend des Gebrauchstages angesetzt und bei 4°C gelagert, um ein Kontaminationsrisiko zu minimieren. Bei Nichtgebrauch am Folgetag wurden die Puffer verworfen. Die Lösungen wurden auf pH= 7,4 eingestellt und steril filtriert.

1x Leffert's Puffer

Der Puffer wurde zu 100mL-Einheiten auf sterile 500mL Schottflaschen abgefüllt.

- 100mL 10x Leffert's
- Aqua dest. auf 1L auffüllen

1x EGTA Puffer

Die gebrauchsfertige 1x EGTA-Lösung wurde in einen sterilen Infusionsbeutel eingefüllt.

- 30mL 10x EGTA
- 1x Leffert's auf 300mL auffüllen

1x CaCl₂

500mL der CaCl₂-Lösung wurden auf eine sterile 500mL Schottflasche abgefüllt, 100mL wurden zum Ansetzen der Collagenase P – Lösung (s. 2.2.3 Enzymlösungen) in ein steriles 100mL Urin Cup überführt.

- 6mL 100x CaCl₂ (2,79 %)
- 1x Leffert's auf 600mL auffüllen

Enzymlösungen

Alle Enzymlösungen wurden 10-20 min. vor Gebrauch angesetzt und steril filtriert. Es wurde der logistisch kürzest realisierbare Zeitraum zwischen Ansatz und Verbrauch gewählt, um ein mögliches Autolyserisiko zu minimieren. Bei Nichtgebrauch innerhalb der angegebenen Zeitspanne wurden die Lösungen verworfen.

Collagenase P-Lösung

Die Collagenase P-Lösung wurde in eine 500mL Schottflasche gefüllt und in einem Wasserbad im Temperaturoptimum bei 37°C bis zum Gebrauch gelagert.

- 30mg Collagenase P
- 100mL 1x CaCl₂ bei 37°C

Protease/DNase I-Lösung

Die Protease/DNase I-Lösung wurde in ein 50mL Falcon[®] abgefüllt und bis zum Gebrauch bei 4°C aufbewahrt.

- 10mg Pronase E (0,1%)
- 2mg DNase I (0,004%)
- 10mL Dulbecco`s 1x PBS

Dichtegradienten

Alle Dichtegradienten wurden am Verbrauchstag angesetzt und in 50mL Falcons[®] bei 4°C bis zum Verbrauch gelagert. Es wurden ausschließlich sterile Lösungen verwendet. Bei Nichtgebrauch wurden die Lösungen verworfen.

Easycoll-Lösung

- 5mL Easycoll Seperating Solution
- Equilibrierung mit 15mL 1x Dulbecco`s PBS

Optiprep[®]-Lösungen

Optiprep[®]-Arbeitslösung (30%):

- 25mL Optiprep[®] Density Gradient Medium (60% ig)
- Equilibrierung mit 25mL 1x Dulbecco`s PBS

20%- Optiprep[®]:

- 10mL Optiprep[®]-Arbeitslösung
- Equilibrierung mit 5mL 1x Dulbecco`s PBS

14%- Optiprep[®]:

- 7mL Optiprep[®]-Arbeitslösung
- Equilibrierung mit 8mL 1x Dulbecco`s PBS

Modifiziertes Dulbecco`s Modified Eagle Medium (M-DMEM)

- Dulbecco`s modified Eagle`s medium (DMEM, low glucose)
- 100µg/mL Penicillin/Streptomycin
- 4mM L-Glutamin/L-Alanin
- 5ng/mL Epithelial Growth Factor (EGF)
- 1µM Insulin (Humaninsulin[®])
- 14ng/mL Glucagon (GlucoGen[®])
- 1µM Dexamethason (Fortecortin[®])
- 10% Fötales Bovines Serum (FBS)

FisH

Stocklösungen

20x SSC (saline sodium citrate)-Puffer

- 87g NaCl in 500mL Aqua dest.
- 44,1g Natriumazetat-Dihydrat auf 500ml
- equilibrieren und auf pH=7,0 einstellen; Lagerung bei 4°C

Citratpuffer-Stammlösungen

- A: 19,2g Zitronensäure auf 1L Aqua dest.
- B: 29,41g Natriumcitrat-Dihydrat auf 1L Aqua dest.; Lagerung bei 4°C

Formalin, 1%ig

- 2,7mL 37% Formaldehyd
- 5mL 1M MgCl₂-Lsg.
- auf 100mL mit 1x Dulbecco`s PBS auffüllen; Lagerung bei 4°C

Pepsinlösung, 10%ig

- 1g Pepsin in 10mL Aqua dest.
- 4 Aliquoten à 2,5mL bei -18°C lagern

Gebrauchslösungen

2x SSC-Puffer

- 100mL 20x SSC-Puffer
- 900mL Aqua dest.

0,4x SSC-Puffer

- 2mL 20x SSC-Puffer
- 98mL Aqua dest.

Citratpuffer-Gebrauchslösung

- 8,5mL von „A“
- 41,5mL von „B“
- mit Aqua dest. auf 500mL auffüllen und auf pH=6,0 einstellen

Formalin, 0,05%ig

- 5,4mL Formalin, 1%ig
- 93,6mL 1x Dulbecco`s PBS

Pepsin-Gebrauchslösung

- 1 Aliquote in 47,5mL 0,01M Salzsäure-Lösung bei 37°C

Waschlösung I

- 0,3mL NP-40
- 99,7mL 0,4x SSC-Puffer

Waschlösung II

- 0,1mL NP-40
- 99,9mL 2x SSC-Puffer

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluoren
AA	Allylalkohol
AB	Auffangbehältnis
Abb.	Abbildung
Alb	Albumin
ALT	Alanin-Aminotransferase
APAAP	Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase
AST	Aspartat-Aminotransferase
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCL ₄	Carbontetrachlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CsA	Cyclosporin A
CT	Cycle Threshold, Schwellenwert-Zyklus
DA	Dark Agouti, Rattenstamm
DA-f	Dark Agouti, Rattenstamm, ♀
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EGF	Epithelial growth factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglycol bis- [2-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
FAM	6-FAM-phosphoramidit
FisH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
gDNA	genomische Desoxyribonucleinsäure
GFP	Green fluorescent protein
GV-SOLAS Science	Gesellschaft für Versuchstierkunde und Society for Laboratory Animal
Hc	Hepatocyte/n
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hPc	hepatische Progenitorzellen
i. p.	Intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kLZTx	kombinierte Leberzelltransplantation
LDH	Lactatdehydrogenase
Lew	Lewis, Rattenstamm
Lew-f	Lewis, Rattenstamm, ♀
Lew-m	Lewis, Rattenstamm, ♂
LSAB	Labelled-streptavidin-biotin
LTx	Orthotope Lebertransplantation
M-DMEM	Modifiziertes Dulbecco's Modified Eagle Medium

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MW	Mittelwert
MW SRY	Mittelwert SRY-positive Kerne
MW Y	Mittelwert Y-positiver Kerne
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Oc	Ovalzellen
OT	Objektträger
OV-6	Oval cell marker 6
PBS	Phosphat buffered saline
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PH	partielle Hepatektomie
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RG	Reaktionsgefäß
s. c.	subcutan
SD	Standardabweichung vom Mittelwert
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
SSC-Puffer	Saline sodium citrate - Puffer
Thy-1	Thymus cell antigen 1
TBS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-gepufferte Salzlösung
Urea	Harnstoff
V.	Vena

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Schröder, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Vergleichende in vivo- und in vitro-Analysen im Rahmen der Etablierung der kombinierten Leber- und Leberzelltransplantation im Rattenmodell*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Igor M. Sauer danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit.

Bei Frau Dr. med. Martina Mogl möchte ich mich ganz herzlich für die Vermittlung der Arbeit, ihre immer kompetenten Ratschläge, sowie ihre freundschaftliche Hilfe in allen Belangen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit sehr geholfen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dipl.-Ing. Susanne Rohn. Ohne ihre zu jeder Zeit selbstverständliche Hilfe und Unterstützung, sowohl auf fachlicher als auch auf freundschaftlich-moralischer Ebene, wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen. Danke auch für die vielen, vielen Stunden gemeinsamer Labor-Arbeit, die mein Leben fachlich und persönlich so sehr bereichert haben.

Des Weiteren möchte mich bei der gesamten AG Sauer, insbesondere bei Frau Dr. med. vet. Henriette Riedel und Frau Kerstin Nehls, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Hilfe bedanken.

Ich danke meiner Familie. Euer ständiger Rückhalt, eure Unterstützung in allen Lebenslagen und eure stets aufmunternden, warmen Worte hatten einen unschätzbar großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.