

Aus der Chirurgischen Klinik,
Charité Campus Mitte | Campus Virchow Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der immunologische Status nach Transplantation MPIO-
markierter Hepatozyten im Großtiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Niebergall
aus Berlin

Datum der Promotion: 07. Dezember 2018

Inhaltsverzeichnis

1. ABSTRAKT	1
2. EINLEITUNG	4
2.1 LEBERZELLTRANSPLANTATION: MEHR ALS EINE ALTERNATIVE?	4
2.1.1 DIE ENTWICKLUNG DER LEBERZELLTRANSPLANTATION	4
2.1.2 VERGLEICH VON LEBERZELL- UND LEBERTRANSPLANTATION	6
2.2 GRENZEN UND BRÜCKEN: PROBLEME UND DEREN LÖSUNGSVERSUCHE	8
2.2.1 LIMITIERUNGEN DER LEBERZELLTRANSPLANTATION	8
2.2.2 DETEKTION TRANSPLANTierter MPIO-MARKIERTER HEPATOZYTEN MITTELS MRT	10
2.3 GROßER ODER KLEINER KAMPF? ASPEKTE DER IMMUNABWEHR	11
2.3.1 TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE	11
2.3.2 DIE IMMUNABWEHR NACH HEPATOZYTENTRANSPLANTATION	13
2.4 FRAGESTELLUNG	16
3. MATERIAL UND METHODEN	18
3.1 MATERIALLISTE	18
3.1.1 REAGENZIEN	18
3.1.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	19
3.1.3 GERÄTE UND SOFTWARE	20
3.1.4 LÖSUNGEN UND MOLEKULARBIOLOGISCHE PRODUKTE	21
3.1.5 MEDIKAMENTE	22
3.2 VERSUCHSABLAUF: TRANSPLANTATION MPIO-MARKIERTER HEPATOZYTEN IM GROßTIERMODELL SCHWEIN	23
3.3 LEBERZELLISOLIERUNG	24
3.3.1 SPENDERTIERE	24
3.3.2 LEBERZELLISOLIERUNG	24
3.3.3 MPIO-MARKIERUNG DER LEBERZELLEN <i>IN VITRO</i>	25
3.4 LEBERZELLTRANSPLANTATION	26
3.4.1 EMPFÄNGERTIERE	26
3.4.2 MEDIKATION	26
3.4.3 ZELLTRANSPLANTATION	27
3.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	29
3.5.1 BLUTENTNAHME	29
3.5.2 PBMC-ISOLIERUNG	30
3.5.3 OBERFLÄCHENFÄRBUNG UND FACS-ANALYSE	31
3.6 <i>IN VITRO</i> VERSUCHE ZUR IMMUNOGENITÄTSUNTERSUCHUNG PORCINER HEPATOZYTEN	33
3.6.1 ZELLKULTUR UND STIMULATION MIT ZYTOKINEN	33
3.6.2 RNA-ISOLIERUNG	34
3.6.3 REVERSE TRANSKRIPTION	35
3.6.4 TAQMAN®-PCR	35
3.7 STATISTISCHE ANALYSE	37
4. ERGEBNISSE	38
4.1 ZELLZAHL UND –VIABILITÄT VOR LEBERZELLTRANSPLANTATION	38
4.2 IMMUNOLOGISCHER STATUS NACH TRANSPLANTATION MPIO-MARKIERTER LEBERZELLEN	39
4.2.1 VERGLEICH IMMUNOLOGISCHER REAKTIONEN ZWISCHEN MPIO-MARKIERTER UND NATIVER LEBERZELLTRANSPLANTATION	42
4.2.2 VERGLEICH IMMUNOLOGISCHER REAKTIONEN BEI TRANSPLANTATION MPIO-MARKIERTER HEPATOZYTEN UND FREIER EISENPARTIKEL	52

4.2.3 ZUSAMMENFASSUNG DER PROZENTUALEN VERÄNDERUNGEN VON LYMFOZYTENSUBPOPULATIONEN BEI TRANSPLANTATION MPIO-MARKIERTER LEBERZELLEN IM VERGLEICH ZU KONTROLLGRUPPEN	59
4.3 IN VITRO STIMULATION DER MHC-EXPRESSION AUF PORCINEN HEPATOZYTEN	60
4.3.1 NACHWEIS DER MHC I-EXPRESSION	61
4.3.2 NACHWEIS DER MHC II-EXPRESSION	63
4.4 AUSWIRKUNGEN DER LEBERZELLTRANSPLANTATION AUF KLINISCHE PARAMETER	64
4.5 KOMPLIKATIONEN	67
5. DISKUSSION	69
5.1 IMMUNOGENITÄT ALLOGENER HEPATOZYTEN	69
5.1.1 LEBERZELLISOLIERUNG, ZELLZAHL UND –VIABILITÄT	69
5.1.2 MHC-EXPRESSION AUF HEPATOZYTEN	70
5.2 IMMUNOLOGISCHE REAKTIONEN AUF TRANSPLANTIERTER MPIO-MARKIERTE LEBERZELLEN	73
5.2.1 IMMUNSUPPRESSION	73
5.2.2 MPIO-MARKIERUNG	75
5.2.3 WIRKUNG DER MPIO-MARKIERUNG AUF IMMUNOLOGISCHE PARAMETER <i>IN VIVO</i>	76
5.2.4 UNTERSCHIEDE IMMUNOLOGISCHER PARAMETER BEZOGEN AUF DIE APPLIKATIONS- ROUTE	80
5.2.5 VERÄNDERUNGEN KLINISCHER PARAMETER ALS AUSDRUCK EINER STATTEGEBTEN IMMUNREAKTION	83
5.3 LIMITIERUNGEN	84
5.4 AUSBLICK	86
6. LITERATURVERZEICHNIS	88
7. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	98
8. LEBENSLAUF	100
9. PUBLIKATIONSListe	101
10. DANKSAGUNG	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Studiendesign	24
Abbildung 2: Zeitliche Abfolge von Blutprobengewinnung für die PBMC-Isolierung und Laboranalyse, Beginn der Immunsuppressionsgabe und Hepatozytentransplantation. 30	
Abbildung 3: Zeitliche Abfolge von Hepatozytenstimulation mit den Zytokinen INF γ und TNF α und anschließender RNA-Isolierung.	33
Abbildung 4: Durchschnittlich transplantierte Zellzahl bei Transplantation von MPIO-markierten Hepatozyten (MPIO) und nativen Hepatozyten (native).....	39
Abbildung 5: Gating der PBMCs im FACS.....	40
Abbildung 6: Gating der PBMCs im FACS.....	41
Abbildung 7: Gating der PBMCs im FACS.....	41
Abbildung 8: Prozentuales Verhalten der CD3+ Zellen im Lymphozyten-Gate nach FACS-Analyse	42

Abbildung 9: Prozentuales Verhalten der Anteiligen CD4+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse.....	43
Abbildung 10: Prozentuales Verhalten der Anteiligen CD8+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse.....	44
Abbildung 11: Prozentuales Verhalten der Anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD4+ Zellen nach FACS-Analyse	46
Abbildung 12: Prozentuales Verhalten der Anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD8+ Zellen nach FACS-Analyse	47
Abbildung 13: Prozentuales Verhalten der Anteiligen MHCII+ Zellen an den CD3- Zellen nach FACS-Analyse.....	49
Abbildung 14: Mean Fluorescence Intensity (MFI) der MHCII+ Zellen in den CD3- Zellen nach FACS-Analyse	50
Abbildung 15: Prozentuales Verhalten der Anteiligen CD3+ Zellen im Lymphozyten-Gate nach FACS-Analyse	52
Abbildung 16: Prozentuales Verhalten der Anteiligen CD4+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse.....	53
Abbildung 17: Prozentuales Verhalten der Anteiligen CD8+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse.....	54
Abbildung 18: Prozentuales Verhalten der Anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD4+ Zellen nach FACS-Analyse	55
Abbildung 19: Prozentuales Verhalten der Anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD8+ Zellen nach FACS-Analyse	56
Abbildung 20: Prozentuales Verhalten der Anteiligen MHCII+ Zellen an den CD3- Zellen....	57
Abbildung 21: MFI der MHCII+CD3- Zellen	58
Abbildung 22: Durch die TaqMan-PCR analysierte Expressionsrate von MHCI	61
Abbildung 23: Durch die TaqMan-PCR analysierte Expressionsrate von MHCII	63
Abbildung 24: CiclosporinA-Serumspiegel der Empfängertiere	65
Abbildung 25: AST-Serumspiegel der Empfängertiere	65
Abbildung 26: ALT-Serumspiegel der Empfängertiere	66
Abbildung 27: Harnstoff-Serumspiegel der Empfängertiere	66
Abbildung 28: Albumin-Serumspiegel der Empfängertiere	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medikamentenplan.....	27
----------------------------------	----

Tabelle 2: Zusammenfassung der prozentualen Veränderungen von
Lymphozytensubpopulationen nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über
A. gastroepiploica, Milzparenchym und Pfortader..... 59

1. Abstrakt

Einleitung: Die Leberzelltransplantation (LCT) stellt eine vielversprechende Therapieoption zur Behandlung metabolischer, akuter oder chronischer Leberversagen dar. Bislang fehlte eine valide Methode zur Detektierbarkeit und Verfolgung der transplantierten Leberzellen. Mit Hilfe der Markierung der Hepatozyten mittels *micron-sized paramagnetic iron-oxide particles* (MPIOs) *in vitro* scheint eine geeignete Lösung gefunden worden zu sein, da die Zellen nach Transplantation *in vivo* kernspintomographisch dargestellt werden können. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Wirkung der MPIOs auf das Immunsystem der Empfänger zu untersuchen.

Methoden: Wir transplantierten MPIO-markierte Leberzellen im Schwein über drei verschiedene Applikationsrouten: die Arteria gastroepiploica, das Milzparenchym und die Pfortader. Als Vergleichsgruppe diente zum einen die Transplantation nicht-markierter Hepatozyten über die genannten Applikationsrouten und zum anderen die Transplantation isolierter MPIOs über die A. gastroepiploica. Nach Isolierung der peripheren mononukleären Zellen aus dem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) erfolgte die Analyse der Lymphozytensubpopulationen in der Durchflusszytometrie. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit dem Immunogenitätspotential von porcinen Hepatozyten. Hierfür wurden porcine Hepatozyten *in vitro* mit den Zytokinen INF γ und TNF α unterschiedlicher Konzentration über 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. In der anschließenden TaqMan-PCR wurde die Expression von MHC I und MHC II analysiert.

Ergebnisse: Es gab Anzeichen für eine Immunaktivierung nach Transplantation sowohl MPIO-markierter als auch nativer Hepatozyten, da es zur Zunahme der CD4+ und CD8+ T-Effektorzellen kam. Dabei scheinen die MPIO-markierten Hepatozyten einen besonders aktivierenden Einfluss auf die CD8+ T-Effektorzellen gehabt zu haben. Isolierte über die A. gastroepiploica injizierte MPIOs vermochten keine Zuwächse der T-Effektorzellen zu bewirken. Die Pfortaderroute erwies sich aus immunologischer Sicht am vorteilhaftesten. Die MHC I- und insbesondere die MHC II-Expression von porcinen Hepatozyten ließ sich durch INF γ und INF γ + TNF α in der Konzentration von jeweils 100 ng/ml steigern.

Schlussfolgerung: Allogene porcine Hepatozyten können ihre Immunogenität über eine Hochregulierung ihrer MHC II-Antigene steigern. Die MPIO-Markierung der

Leberzellen zur Verlaufskontrolle in der MRT nach Transplantation hatte keine signifikanten zusätzlichen immunogenen Auswirkungen auf das Empfängerimmunsystem. Trotzdem führt die LCT zu einer Aktivierung des Rezipientenimmunsystems, so dass eine Immunsuppression unverzichtbar ist.

Fortschritte in Bezug auf Immunreaktion, Detektierbarkeit und anhaltende Integration und Proliferation der Hepatozyten könnten die LCT zur Behandlung transplantationspflichtiger Lebererkrankungen vorantreiben.

Background: Liver cell transplantation (LCT) is a promising approach for treatment of metabolic, acute and chronic liver diseases. Non-invasive methods for detection and monitoring are required. Labeling of hepatocytes with micron-sized paramagnetic iron-oxide particles (MPIOs) can help to detect the labeled liver cells with magnetic resonance imaging. The aim of this study was to investigate the effect of MPIOs for the immune system of the recipients.

Methods: MPIO-labeled liver cells from landrace piglets were transplanted to minipigs into the liver via intraportal infusion, direct injection into the splenic parenchyma or intra-arterial infusion to the spleen. The control groups received native hepatocytes via the same 3 application routes or pure MPIOs which were injected intra-arterially to the spleen. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood samples and analysed by fluorescence-activated cell scanning (FACS). A second part of this study focused on the immunogenicity of porcine hepatocytes. Therefore, the porcine hepatocytes were stimulated with the cytokines INF γ and TNF α in different concentrations over a period of 24, 48 and 72 hours to analyse the expression of MHC I and MHC II by TaqMan-PCR.

Results: After the transplantation of MPIO-labeled and native liver cells the CD4⁺ und CD8⁺ T-effector cells increased, especially the CD8⁺ T-effector cells after transplantation of MPIO-labeled liver cells. Pure MPIOs injected intra-arterially to the spleen had no effect on the T effector cells. The intraportal infusion into the liver had least effects on the T effector cells compared to the other application routes.

The expression of MHC I and MHC II were raised by stimulation with the cytokines INF γ und INF γ + TNF α at a concentration of 100 ng/ml.

Conclusion: Allogeneic porcine hepatocytes can increase the immunogenicity by expression of MHC II. Labeling liver cells with MPIOs had no significant additional adverse effects on the immune system of the recipients. Nevertheless,

immunosuppression is necessary due to the activation of the immune system of the recipients by LCT. Further evaluation of immune activation, detection, integration and proliferation of hepatocytes can help to promote LCT as an alternative to whole-organ liver transplantation.

2. Einleitung

"Jeder Mensch hat eine Leber, eine Milz, eine Lunge und eine Fahne; sämtliche vier Organe sind lebenswichtig. Es soll Menschen ohne Leber, ohne Milz und mit halber Lunge geben; Menschen ohne Fahne gibt es nicht" ¹ (Kurt Tucholsky). Unabhängig von seiner politischen Botschaft muss man Kurt Tucholsky in einem Punkt vehement widersprechen: Ein Mensch kann ohne Milz und mit halber Lunge leben, aber niemals ohne Leber. Denn die Leber ist ein unverzichtbares Organ und ein beeindruckendes noch dazu. Kein anderes erfüllt so viele unterschiedliche Aufgaben wie sie. Als größtes Stoffwechselorgan und größte Drüse des menschlichen Körpers ist ihre Funktion mannigfaltig und umfasst die Synthese von Glukose, Ketonkörpern, Cholesterin und Bluteiweißen, die Speicherung von Glykogen, Fett und Vitaminen, die Bildung der Galle sowie die Entgiftung bzw. den Abbau von Erythrozyten, Bilirubin, Ammoniak, Steroidhormonen und Medikamenten ². Doch die vielen Leistungen der Leber bedeuten gleichzeitig, dass Lebererkrankungen unterschiedlichster Ätiologien häufig lebensbedrohlich sind. Neben dem Ansporn für Wissenschaft und Forschung, geeignete Therapien bei Leberversagen zu erforschen, ist es auch die einzigartige Proliferations- und Regenerationsfähigkeit der Leber, die dieses Forschungsfeld so spannend macht.

2.1 Leberzelltransplantation: Mehr als eine Alternative?

2.1.1 Die Entwicklung der Leberzelltransplantation

Nachdem die erste, leider erfolglose Lebertransplantation 1963 in den USA von T.E. Starzl durchgeführt wurde, war erst mit Einführung des Immunsuppressivums Ciclosporin A 1979 eine deutliche Verbesserung der Überlebensraten zu verzeichnen. Die Hoffnung war groß, mit der Lebertransplantation die geeignete Behandlungsmöglichkeit für terminale Lebererkrankungen gefunden zu haben ^{3, 4}. Heute gilt die orthotope Lebertransplantation (OLT) als Standardtherapie bei akutem und chronischem Leberversagen sowie bei metabolischen Lebererkrankungen ^{5, 6}. Allerdings sieht sie sich vielen Problemen wie dem Missverhältnis zwischen Organangebot und –bedarf, der Invasivität des großen bauchchirurgischen Eingriffs mit konsekutiven Komplikationen sowie den Folgen der notwendigen Unterdrückung des Immunsystems konfrontiert ^{6, 7, 8}. Aus diesen Gründen wurden alternative

Therapieansätze wie die Leberzelltransplantation (LCT) entwickelt, die nach zumeist intraportaler oder intrasplenischer Hepatozytenapplikation die Repopulation der Leber zur funktionellen Unterstützung dieser zum Ziel hat ⁹. Nachdem 1969 die technische Umsetzbarkeit der Leberzellisolierung mit Etablierung eines Protokolls durch Berry und Friend mit Modifikation nach Seglen den Startschuss für weitere Entwicklungen gab ^{10, 11}, folgten in den späten 1970er Jahren die ersten erfolgversprechenden Tierversuche ^{12, 13}. Die Gunn-Ratte diente als Modell des Crigler-Najjar-Syndroms Typ 1, bei dem es durch einen Enzymdefekt der Bilirubin-UDP-Glucuronosyltransferase zur gestörten Glucuronidierung mit konsekutivem exzessivem Anstieg von unkonjugiertem Bilirubin kommt. Durch die intraportal infundierten Hepatozyten konnte eine Reduktion des Serum-Bilirubinspiegels erzielt werden ¹². Doch der Vormarsch der zunehmend erfolgreichen Lebertransplantation stoppte weitere Forschungsbemühungen auf diesem Gebiet. Erst Limitierungen der Lebertransplantation brachten den Stein auf dem Forschungsfeld der Leberzelltransplantation wieder ins Rollen. Es folgten zunächst vor allem präklinische Studien an Tiermodellen als Träger metabolischer Lebererkrankungen. Sowohl die Leberzellisolierung als auch die Wirkung der transplantierten Zellen auf den zu untersuchenden biochemischen Parameter und das Überleben wurden hierbei erforscht ^{14, 15, 16}. In einem Rattenmodell für Morbus Wilson, der durch Störung der Kupferausscheidung mit daraus folgenden Leberschäden und neurologischen Defiziten charakterisiert ist, führte die LCT zu einer 60%-igen Reduktion der hepatischen Kupferablagerung im Vergleich zu unbehandelten Tieren ¹⁴. Dennoch verstarben 7,4% der Tiere an akutem Leberversagen und 15% auf Grund von perioperativen Komplikationen. Zur Untersuchung der regenerativen Leberkapazität erfolgte die wiederholte LCT in einem Mausmodell für Tyrosinämie Typ I, die sich durch Zellschäden in Leber, Niere und Gehirn äußert. Dies resultierte in einer kompletten Repopulation der Leber durch transplantierte Hepatozyten mit Normalisierung der ALT- und Bilirubin-Serumspiegel ¹⁵. In Watanabe-Hasen mit defektem LDL-Rezeptor als Modell für die familiäre Hypercholesterinämie bewirkte die intraportale LCT eine 2-3 Wochen andauernde Serum-LDL-Reduktion auf 60% und die intraperitoneale Applikation eine Serum-LDL-Reduktion auf 45% des Ausgangswertes für mehr als 4 Wochen ¹⁶. Ebenso stellte das akute Leberversagen eine weitere Indikation zur Leberzelltransplantation dar und wurde zunächst im Tiermodell untersucht ^{17, 18}. Bei ischämisch bedingtem akutem Leberversagen führte

die intrasplenische LCT 48 Stunden vor induzierter Leberischämie zu einem signifikant geringerem Anstieg des Serum-Ammoniakspiegels sowie einer höheren Blutglukose als bei Tieren ohne LCT ¹⁸. Nach 75%-iger Leberteileresektion und portocavalem Shunt konnte die intrasplenische und intraperitoneale LCT eine signifikante Reduktion der Mortalitätsrate bei Ratten erzielen ¹⁷. Den Weg in die Klinik zur ersten Anwendung beim Menschen fand die Leberzelltransplantation 1992 ¹⁹. Zehn Patienten mit chronischer Leberinsuffizienz erhielten autologe Hepatozyten, die aus den links-lateralen Segmenten der Leber gewonnen wurden. *Fitzpatrick* et al. berichteten 2009 in ihrer Übersichtsarbeit von mehr als 80 klinischen Fallbeispielen ⁶. Der ersten Leberzelltransplantation auf Grund des Crigler-Najjar-Syndroms Typ 1 unterzog sich ein 10-jähriges Mädchen ²⁰. Der Serum-Bilirubinspiegel blieb anschließend mehr als 300 Tage nach Transplantation auf stabilem Niveau, so dass die Phototherapie von 12 auf 6 Stunden täglich reduziert werden konnte. Dennoch wurde nach 4 Jahren eine OLT zur definitiven Therapie notwendig. Andere metabolische Lebererkrankungen wie die familiäre Hypercholesterinämie, Harnstoffzyklusdefekte sowie das durch Alkohol, Medikamente, Viren oder Pilze ausgelöste akute und chronische Leberversagen waren weitere Indikationen zur klinischen Leberzelltransplantation. Die Ergebnisse reichten von fehlender Wirkung mit konsekutivem Tod der Patienten über zeitweilige Verbesserungen der Leberfunktion, beispielsweise mit Reduktion von Ammoniak und Bilirubin, und erfolgreicher Überbrückung zur OLT bis hin zur völligen Heilung ^{21, 22, 23}. In einem Fall führte die Leberzelltransplantation bei akutem Leberversagen pilztoxischer Genese zur vollständigen Erholung der Leber mit Absetzen der Immunsuppression nach 12 Wochen ⁵. Insgesamt profitierten von 20 Patienten, die eine LCT auf Grund einer chronischen Leberinsuffizienz erhielten, 60%, weil sie entweder die Zeit bis zur OLT überlebten oder diese gar nicht mehr benötigten ²¹. Von 22 Patienten mit akutem Leberversagen profitierten 40,9 % von der LCT (Stand 2009). Trotz der kleinen Fallserien und Einzelfallberichte mit einer großen Bandbreite unterschiedlicher Effekte zeigen die positiven Ergebnisse, dass die Leberzelltransplantation als Therapie des akuten und chronischen Leberversagens die Möglichkeit bietet, mehr als eine „Bridging-to-transplantation“-Option zu werden.

2.1.2 Vergleich von Leberzell- und Lebertransplantation

Der Mangel an geeigneten Spenderorganen stellt den größten limitierenden Faktor der Lebertransplantation dar ⁷. In den USA sterben ca. 5 -10% der gelisteten

Patienten, weil sie nicht rechtzeitig ein passendes Spenderorgan erhalten²⁴. Im Jahr 2013 erreichte die Organspenderate in Deutschland eine neue Talsohle: Durch die Krankenhäuser wurden 2219 Hirntote gemeldet, bei 905 davon wurde der Organspende zugestimmt²⁵. 2016 sank die Rate weiter auf 857 Organspenden ab²⁶. Eine weitere Einschränkung stellt die Invasivität des Eingriffs da, der bei Patienten mit kardiopulmonalen Komorbiditäten sehr risikoreich ist. Auch erhöhen die intra- und postoperativen Komplikationen Morbidität und Mortalität²⁴. Demgegenüber ist die Leberzelltransplantation als weniger invasiver Eingriff durch ein deutlich geringeres peri-interventionelles Risiko gekennzeichnet: Über einen radiologisch oder operativ platzierten Katheter können die Zellen in die Pfortader appliziert werden⁵. Die Kryokonservierung der isolierten Zellen stellt logistisch einen großen Vorteil dar und erlaubt auch eine sofortige Anwendung im Bedarfsfall, beispielsweise im akuten Leberversagen²⁷. So können die transplantierten Leberzellen funktionell die erkrankte Leber bis zur Regeneration unterstützen oder die Zeit bis zur OLT überbrücken⁹. Insbesondere qualitativ minderwertige Organe, welche für eine Ganzorgantransplantation nicht geeignet sind, können als Zellquelle genutzt werden²⁸. Tierexperimente zeigen, dass nur relativ wenig Lebergewebe für die Korrektur eines metabolischen Defekts benötigt wird, so dass prinzipiell eine Leber für mehrere Empfänger genutzt werden kann^{5, 29}. Des Weiteren könnten die Hepatozyten vor Applikation genetisch modifiziert werden, um ein fehlerhaftes Enzym oder einen fehlerhaften Rezeptor zu ersetzen^{5, 30, 31}. Eine weitere Überlegenheit der LCT liegt darin, dass das eigene erkrankte Organ nicht entfernt werden muss und somit die Möglichkeit zur spontanen Regeneration bestehen bleibt. So bleibt insbesondere bei metabolischen Lebererkrankungen die ansonsten meist gute Leberfunktion erhalten, während eine Ganzorgantransplantation immer das Risiko des Transplantatversagens beinhaltet. Morbidität, Mortalität und initiale Kosten sind signifikant geringer als jene bei OLT³². Jedoch ist sowohl bei der Ganzorgan- als auch bei der Leberzelltransplantation eine lebenslange Immunsuppression erforderlich. Die häufigsten Nebenwirkungen sind hierbei eine Verschlechterung der Nierenfunktion bis hin zur Dialysepflichtigkeit, neurologische, kardiale und gastrointestinale Probleme, eine Knochenmarksdepletion sowie ein erhöhtes Risiko für maligne Erkrankungen³³. Während die Immunsuppression nach OLT bereits ein Transplantatüberleben von über 25 Jahren ermöglicht, ist die adäquate Medikation nach LCT hinsichtlich Langzeiterfolg noch unbekannt^{5, 34}.

2.2 Grenzen und Brücken: Probleme und deren Lösungsversuche

2.2.1 Limitierungen der Leberzelltransplantation

Neben den zahlreichen Fortschritten auf dem Gebiet der Leberzelltransplantation gibt es auch Grenzen, deren Überwindung den derzeitigen Forschungseifer begründen. Die größte Hürde stellt das sowohl quantitativ als auch qualitativ limitierte Angebot dar: Die Quellen der zu isolierenden Leberzellen sind meist marginale Organe, also Lebern, die wegen ausgeprägter Steatose, langer Ischämiezeit, hohen Spenderalters und anderer Gründe zur Ganzorganspende abgelehnt wurden ²⁷. Um jedoch eine befriedigende Qualität und Viabilität der isolierten Hepatozyten zu erreichen, ist diese Grundlage oft nicht ausreichend ⁵. In einigen Zentren erfolgt deswegen bei einer Teilung der Spenderleber für einen erwachsenen und einen pädiatrischen Patienten die Hepatozytenisolierung aus dem nicht transplantierten Segment IV ³⁵. Zum einen wird dadurch eine signifikant höhere Zellviabilität erzielt, da nur gesunde Lebern mit qualitativ hochwertigen Hepatozyten überhaupt als Spenderorgan zugelassen werden und zum anderen profitieren 3 Patienten von nur einer Leber ⁵.

Weiterhin wirft die Isolierungstechnik immer noch Fragen auf: Für die klinische Anwendung muss eine Zellviabilität von mehr als 60% erreicht werden, was jedoch nicht immer gelingt. Außerdem ist nicht bekannt, wie viele Zellen in wie vielen Applikationssitzungen infundiert werden müssen, um Defekte auszugleichen und eine adäquate Leberleistung zu erzielen ³⁶. Beim Crigler-Najjar-Syndrom hat sich gezeigt, dass ca. 12% der Lebermasse des Empfängers benötigt werden ⁶. In wie weit diese Erfahrung jedoch auf andere Ätiologien der Leberinsuffizienz übertragbar ist, bleibt bis dato unklar. Als nächste Herausforderung zeigt sich die Wahl des geeigneten Applikationsortes. Leber und Milz sind die gebräuchlichsten Implantationsorte für eine erfolgreiche Integration und Funktionalität der Leberzellen ²⁹. Während beim chronischen Leberversagen die Architektur der zirrhotischen Leber das Anwachsen über die Pfortader applizierter Zellen erschwert, finden sich in der Milz als in diesem Falle alternativen Zielort zahlreiche immunkompetente Zellen, die eine Abstoßung initiieren könnten ⁶. Bei akutem Leberversagen und metabolischen Lebererkrankungen hingegen ist die intraportale Applikation bisher Standard. Wegen der Gefahr des portalen Hochdrucks und der Mikrothrombenbildung sollte hierbei jedoch nicht mehr als 1% der Lebermasse in einer Sitzung transplantiert werden, obwohl insgesamt etwa 10% der Empfängeremasse erreicht werden müssen. Durch gleichzeitige Heparinabgabe und wiederholte Infusionen können diese Gefahren

minimiert werden^{6, 29}. Die intraperitoneale Route macht zwar die Applikation einer suffizienten Menge möglich³⁷, aber auch hier sind die transplantierten Zellen dem Angriff des Immunsystems ausgesetzt. Die Nierenkapsel wurde in Tierversuchen als Implantationsort untersucht, erwies sich jedoch als zu klein³⁸. Daneben liegt eines der größten Probleme im erforderlichen Anwachsen und Integrieren der transplantierten Hepatozyten in das Empfängerleberparenchym. Ein Hepatozyt hat einen Durchmesser von 20 – 40 µm. Dagegen sind die Fenestrations der Sinusoide, die es zu überwinden gilt, nur 6 - 9 µm groß. Dieses Missverhältnis löst eine portale Hypertension und einen transienten Ischämie-Reperfusionsschaden aus, der wiederum Kupffer-Zellen stimuliert und zur TNF α -Ausschüttung führt. Das erhöht die Gefäßpermeabilität: Die Hepatozyten heften sich am aktivierten Endothel an und gelangen durch die sinusoidalen Fenestrations ins Leberparenchym, wo sie *gap junctions* und Gallenkanälchen 3 – 7 Tage nach Zelltransplantation bilden^{39, 40}. Für den klinischen Alltag ist es wichtig, Verbleib und Integration transplantierte Zellen nicht nur über Veränderungen biochemischer Parameter, sondern auch über bildmorphologische Verfahren nachzuweisen⁵. Als derzeitiges Routinenachweisverfahren steht lediglich die Biopsie für die Analyse von *short-tandem-repeats*, die als Wiederholung kurzer Basenpaarmuster auf der DNA für die genetische Individualisierung verwendet werden⁴¹, die Bestimmung der Genexpression von leberspezifischen Transkripten⁴² oder die *Real-time*-Polymerasekettenreaktion (PCR) des Y-Chromosoms bei Geschlechtsunterschieden von Empfänger und Spender⁴³ zur Verfügung. Diese Tests sind jedoch durch ihre Invasivität und den damit verbundenen Risiken sowie die Analyse nur eines kleinen nicht zwingend repräsentativen Teils der Leber limitiert⁵. Aus diesem Grund sind neuartige nicht-invasive Methoden erforderlich, um das Schicksal transplantierte Zellen zu verfolgen. In Tierexperimenten gelang durch Zellmarkierung mit Radioisotopen wie 111-Indium⁴⁴ und 99m-Technetium⁴⁵ der Nachweis von Hepatozyten. Da die Isotope allerdings zerfallen und gleichzeitig eine Strahlenbelastung darstellen, kann diese Technik nur eine kurze Detektion bei einmaliger Anwendung liefern. Eine vielversprechende Möglichkeit bietet daher die Magnetresonanztomographie (MRT), über die Zellen, welche *in vitro* mit einem Kontrastgeber markiert wurden, nachgewiesen werden können^{46, 47, 48, 49, 50, 51, 52}.

2.2.2 Detektion transplanteder MPIO-markierter Hepatozyten mittels MRT

Für die Leberzelltransplantation sind zuverlässige nicht-invasive Methoden zur Beurteilung des Zellüberlebens und der Zellintegration unverzichtbar⁵³. Die Magnetresonanztomographie kann prinzipiell als geeignetes bildgebendes Verfahren dienen. Einerseits bietet sie eine detaillierte Wiedergabe anatomischer Verhältnisse, andererseits kommt im Vergleich zu anderen bildgebenden Verfahren bei der MRT weder Röntgen- noch Gammastrahlung zum Einsatz⁵⁴. Somit kann sie ohne größere Risiken für den Patienten angewandt werden und eignet sich für eine längerfristige Verlaufskontrolle⁵². Der Gebrauch von intrazellulären kontrastgebenden Substanzen, welche vor Transplantation mit den Zellen inkubiert werden, ermöglicht ihre Darstellung in der MRT. Das erste von der *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassene MR-Kontrastmittel war Gadopentetat-Dimeglumin, das jedoch wegen langer Retentionszeiten im Körper und noch unklaren Abbaumechanismen, Toxizität und reduzierter T1-Relaxivität nie den Sprung in die klinische Testung zur Verfolgung transplanteder Zellen schaffte⁴⁹. Durch Markierung der Zellen mittels superparamagnetischer Eisenoxid-Partikel (*superparamagnetic iron-oxide particle*, SPIO) wird in der MRT ein hypointenses Signal in der T2-/ T2*-Wichtung erzeugt, so dass eine *in vivo* Darstellung der SPIO-markierten Zellen möglich wird⁴⁸. Erste klinische Studien berichteten über die Markierung von dendritischen, neuronalen Stamm- und Inselzellen und deren erfolgreiche kernspintomographische Visualisierung^{49, 55, 56}. Für eine sichere Detektion braucht es aber eine große Beladungszahl von Eisenpartikeln pro Zelle, um den nötigen Kontrast zu erreichen. Darüber hinaus besteht durch instabile Eigenschaften der SPIOs die Gefahr der nachlassenden Darstellbarkeit sowie der Zytotoxizität⁵². Zusätzlich sind bei Übertragung dieser Technik in den Klinikalltag, wo andere Magnetresonanztomographen, Magnetspulen und Untersuchungssequenzen als in der Kleintierforschung zur Verfügung stehen, Kontrastgeber mit hoher Relaxivität erforderlich. Diese Limitierungen scheinen Eisenoxid-Partikel in Mikrometergröße (*micron-sized paramagnetic iron-oxide particle*, MPIO) zu überwinden⁵¹. Die Partikel Aufnahme in die Zellen ist sicher und schnell, der Kontrast auf Grund des höheren Eisengehalts größer, die Auflösung besser und die Relaxivität höher, was zu einem größeren Grad an Hypointensität in der MRT führt⁵¹, so dass die Detektierbarkeit auf Einzelzellniveau möglich ist^{50, 57}. *Shapiro* et al. konnten zeigen, dass Zellen, die mit MPIOs markiert wurden, den 3-fachen Eisengehalt enthielten im

Vergleich zur SPIO-Markierung⁵⁸. Ein Protokoll zur Markierung menschlicher Hepatozyten mit MPIOs, bei dem pro Leberzelle 30 Partikel für 4 Stunden in einer Adhäsionskultur inkubiert werden, konnte bereits etabliert werden⁵². *In vitro* waren die Zellen mit einem 3.0 Tesla MR-Tomographen nachweisbar und Markierung und Resuspension hatten im Vergleich zu Kontrollgruppen keine negativen Auswirkungen auf Viabilität, enzymatische und metabolische Aktivitäten der Zellen⁵². Die Zellmarkierung mit eisenoxidhaltigen Partikeln *in vitro* und die dadurch bedingte Visualisierbarkeit in der MRT *in vivo* hat das Potential, von einer vielversprechenden Technik zur Identifikation transplantierte Hepatozyten zur Standardmethode zu werden.

2.3 Großer oder kleiner Kampf? Aspekte der Immunabwehr

2.3.1 Transplantationsimmunologie

Jegliche Art von allogener Transplantation muss sich auch immer der Herausforderung ihrer Wirkung auf das Empfängerimmunsystem und dessen Reaktion stellen. Immunmechanismen bei Transplantationen werden primär von T-Zellen vermittelt⁵⁹. T-Zellen erkennen fremde Antigene über peptidbindende Glykoproteine, den MHC-Molekülen, die das an sich gebundene Antigen auf der Zelloberfläche präsentieren⁶⁰. Diese Zelloberflächenglykoproteine, die polymorph sind, werden von Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC, auch *human leukocyte antigens*, HLA), die polygen sind, codiert: Es gibt die MHC-Klasse-I-Hauptgene HLA-A, -B, -C und die MHC-Klasse-II-Hauptgene HLA-DR, -DP, -DQ, so dass jedes Individuum über eine Gruppe von MHC-Molekülen mit unterschiedlichen Peptidbindungseigenschaften verfügt⁶¹. Zytokine wie Interferon gamma (INF γ) und Tumornekrosefaktor alpha/beta (TNF α/β), die während einer Immunantwort freigesetzt werden, können die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) sowie Parenchymzellen verschiedener Organtransplantate verstärken und sogar die Expression von MHC-II-Molekülen bei bestimmten Zelltypen auslösen, die diese Moleküle normalerweise nicht herstellen^{62 63}. Somit bietet der Nachweis ihrer Hochregulierung, also die vermehrte Expression dieser Moleküle, einen guten Indikator für eine stattgehabte Immunreaktion. Unterscheiden sich Spender und Empfänger in ihren MHC-Molekülen, lösen die Alloantigene auf dem Transplantat eine Immunreaktion aus⁶⁴. Daneben existieren

Nebenhistokompatibilitätsantigene, die als Peptide von MHC-Molekülen auf den Zellen des Transplantats präsentiert werden und bei Unterscheidung zwischen Donor und Empfänger zusätzlich zu einer Abstoßungsreaktion beitragen können⁶⁴. Deshalb wird bei Nieren-, Pankreas-, Dünndarm- und Knochenmarkstransplantationen eine möglichst große HLA-Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger gesucht⁶⁵. Bei der Lebertransplantation scheint allerdings der Einfluss des sonst so nötigen HLA-*matching* auf das Transplantatüberleben eher gering zu sein⁶⁶. Studien konnten überwiegend keinen Einfluss des HLA-*matching* auf das Langzeitergebnis belegen. Insgesamt sind die klinischen Erfolge auf dem Gebiet der Transplantationsmedizin eher auf Fortschritte in der Immunsuppressionstherapie als auf eine bessere Abstimmung von HLA-identischen Spendern und Empfängern zurückzuführen⁶⁴.

Mit Hilfe ihrer T-Zell-Rezeptoren, von denen jede T-Zelle etwa 30 000 besitzt, erfolgt die Kontaktaufnahme der T-Zellen sowohl mit dem MHC-Molekül als auch mit dem antigenen Peptid⁶⁷. Es gibt zwei wichtige Untergruppen von T-Zellen, die sich durch die Zelloberflächenproteine *cluster of differentiation* (CD) 4 und CD8 unterscheiden. CD4 bindet an das MHC II-Molekül, das auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen zu finden ist, während CD8 auf zytotoxischen T-Zellen das MHC I-Molekül, welches sich auf allen kernhaltigen Zellen befindet – auf Leberzellen im Vergleich zu Immunzellen in kleinerer Anzahl – erkennt⁶⁸. CD4 und CD8 dienen als sogenannte Co-Rezeptoren: Wenn sie und der T-Zell-Rezeptor gleichzeitig an denselben MHC-Peptid-Komplex binden können, erhöht sich die Empfindlichkeit einer T-Zelle für ein Antigen stark, so dass sich die zur Aktivierung der T-Zelle benötigte Antigenmenge auf ein Hundertstel verringert^{69, 70}. Die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und seinem Liganden, dem MHC-I- bzw. MHC-II-Oberflächenmolekül, das ein entsprechendes immunogenes Peptid bindet, stellt den ersten Stimulus zur Aktivierung naiver T-Zellen dar. Der zweite Stimulus ist nicht antigenspezifisch und besteht aus der Interaktion zwischen einer Vielzahl von co-stimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von APCs und den korrespondierenden Rezeptoren auf T-Zellen⁷¹.

Die Alloantigene eines Transplantats werden den T-Lymphozyten des Empfängers auf zwei Arten präsentiert. Organtransplantate enthalten antigenpräsentierende Zellen des Spenders, die allogene MHC-Moleküle exprimieren und einen wichtigen Stimulus für die Alloreaktivität der Empfänger-T-Zellen darstellen. Man nimmt an, dass bei dieser direkten Erkennung die APCs das Transplantat verlassen und über

die Lymphflüssigkeit zu den regionalen Lymphknoten gelangen. Dort können sie naive T-Zellen des Empfängers aktivieren, die entsprechende T-Zell-Rezeptoren tragen. Beim indirekten Weg nehmen APCs des Empfängers allogene MHC-Proteine auf und präsentieren diese mit Hilfe der eigenen MHC-Moleküle den eigenen T-Zellen⁷². Darüber hinaus exprimieren antigenpräsentierende Zellen co-stimulatorische Faktoren, die beispielsweise in der B7-CD28-Interaktion münden und für die Aktivierung der T-Zellen unerlässlich sind^{73, 74}. Nach Aktivierung bilden die T-Zellen das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) und induzieren die Synthese der α -Kette (CD25) des IL-2-Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Während die β - und γ -Ketten des Rezeptors auch im unaktivierten Zustand vorhanden sind, findet die Bildung der α -Kette erst nach Antigenbindung statt. Erst wenn der Rezeptor aus allen 3 Untereinheiten besteht, ist die Affinität zwischen ihm und IL-2 ausreichend hoch. CD 25 dient demnach als guter Aktivierungsmarker des Immunsystems. IL-2 fördert als Wachstumsfaktor die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen⁷⁵. Am Ende der Immunaktivierungskaskade stehen die T-Effektorzellen zum Angriff bereit. Zu ihren wichtigsten Aufgaben gehören die Apoptoseauslösung in den Zielzellen durch zytotoxische CD8+ T-Zellen^{76, 77}, die Aktivierung von Makrophagen durch INF- γ -produzierende CD4+ Th1-Zellen, die zusammen die zellvermittelte Immunität bilden^{78, 79} sowie die über CD40-CD40-Liganden-Bindung und Zytokinausschüttung vermittelte antigenspezifische CD4-B-Zell-Interaktion. Letztere führt zur B-Zellproliferation und -differenzierung, was in der Antikörperbildung für die humorale Immunreaktion mündet^{80, 81}.

2.3.2 Die Immunabwehr nach Hepatozytentransplantation

Ursprünglich dachte man, bei der Leberzelltransplantation ein leichtes Spiel auf dem Kampffeld der Empfängerimmunzellen gegen Fremdleberzellen zu haben, da Hepatozyten als weniger immunogen als Ganzorgantransplantate galten und eine Immunsuppression somit verzichtbar würde⁴⁰. Grund dafür war das Wissen über die Leber als immunprivilegiertes Organ⁸², das bei Transplantationen in Tiermodellen sogar ohne Immunsuppression akzeptiert wurde⁸³ sowie die Erkenntnis über die Toleranzeigenschaften von Leberzellen⁸⁴. Spenderlebern sind in der Lage, eine Immuntoleranz zu induzieren und damit sogar andere parallel transplantierte Organe zu schützen⁸³. Bei der OLT reichen im Vergleich zu anderen soliden Organen oft weniger Immunsuppressiva aus⁸⁵. *Bumgardner* und *Orosz* fanden jedoch bei der Transplantation transgener Leberparenchymzellen auf Grund ihrer großen

Antigenität eine schnelle Abstoßungsreaktion vor⁸⁶. Bei der Autopsie eines Patienten nach Hepatozytentransplantation auf Grund eines akuten Leberversagens konnten 38 Tage nach Absetzen der Immunsuppression weder Hepatozyten in der Milz noch in der Leber nachgewiesen werden²². Allogene transplantierte Hepatozyten überleben demnach nur 7 - 10 Tage ohne Immunsuppression⁸⁵. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz von Immunogenität zwischen Leber und Leberzellen könnte die spezielle Anatomie und Funktion der Leber sein. Diese muss von Hause aus über das Pfortadersystem zufließende Fremddantigene und potentiell immunogene Elemente aus der Milz tolerieren⁸⁶ und weist eine einzigartige dreidimensionale Architektur auf, die einen Angriff des Immunsystems im Organverband im Vergleich zur Einzelzelle erschwert. Zudem können bei Hepatozyten während des Isolierungsprozesses Oberflächenproteine verändert werden⁸⁷, über welche sie erkennbar(er) werden. Folglich kann bei der Leberzelltransplantation nicht auf Immunsuppressiva verzichtet werden. Es gibt aber keinen allgemeinen Konsens über die Art des Regims. Die meisten Zentren benutzen das Protokoll der Lebertransplantation, bei dem Tacrolimus oder Ciclosporin, beides Calcineurin-Inhibitoren, in Kombination mit Steroiden verabreicht werden. Dieses Schema wird zum Teil um Sirolimus, das die Zytokin-vermittelte Signaltransduktion und somit die Aktivierung und Progression der T-Lymphozyten hemmt oder Mycophenolat-Mofetil als Inhibitor der Synthese der Guanin-enthaltenen Purine, die unerlässlich für die Proliferation von Lymphozyten sind, ergänzt^{5, 30}. Zusätzlich kommen monoklonale Antikörper gegen den Interleukin-2-Rezeptor wie Basiliximab zum Einsatz⁸⁸. Doch trotz der Unterdrückung des Immunsystems gibt es Probleme hinsichtlich des Langzeitüberlebens der Hepatozyten: Nach etwa 6 - 9 Monaten gehen die Zellen unter. Die Gründe dafür liegen noch im Verborgenen: Sind es unspezifische Mechanismen wie Apoptose oder spezifische zellvermittelte Mechanismen oder humorale Abstoßungsreaktionen⁶? Es gibt wenige Studien, die sich mit dieser Frage bei Leberzelltransplantation beschäftigen. *Allen* et al. untersuchten den Untergang der Spenderhepatozyten bei einem Patienten mit Crigler-Najjar-Syndrom Typ I und beobachteten, dass sich nach erfolgreichem Anwachsen der Zellen eine graduelle Funktionsabnahme bedingt durch den Verlust der Zellen einstellte⁸⁷. Nachdem es keinen Hinweis auf eine humorale Antwort gab, schlossen die Autoren auf eine T-Zell-vermittelte Abstoßung: Der Empfänger zeigte eine CD8+ Alloreaktivität gegen ein bestimmtes HLA-Klasse-I-Antigen, welches nur vom Hepatozytenspender

stammen konnte ⁸⁷. Ein anderer Aspekt lässt sich beim Prozess der Leberzellisolierung beleuchten: Immunkompetente Zellen wie antigenpräsentierende Zellen werden dabei durch die Purifikation der Hepatozyten meist entfernt. Diese Zellen sind aber nicht nur auf dem Weg zu einer Immunantwort wichtig, sondern aktivieren auch T-regulatorische Zellen, die wiederum für die Toleranzentwicklung essentiell sein sollen ⁸⁹. Weiterhin exprimieren Hepatozyten auf ihrer Oberfläche das HLA-Antigen-I sowie andere Proteine wie CD40. *In vitro* Studien mit menschlichen Hepatozyten haben ergeben, dass die Bindung von CD40 an seinen Liganden CD154 (CD40-Ligand) auf T-Zellen, ein Vertreter der TNF-Familie, eine T-Zellaktivierung und Apoptose vermittelt ⁹⁰. Außerdem exprimieren Leberzellen Oberflächenadhäsionsmoleküle wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1), das vaskuläre Adhäsionsprotein (*vascular adhesion protein*, VAP) und E-Cadherin, die zur Aktivierung von T-Zellen beitragen könnten ⁹¹. Der Ligand von E-Cadherin, CD103, ist auf T-Zellen hochreguliert, die die Leber nach Hepatozytentransplantation infiltrieren. Im Gegensatz dazu kommt es bei Inselzelltransplantaten nicht zur Initiierung solch einer Immunantwort ⁹². Man nimmt an, dass alles zusammen Teil eines komplexen CD8-abhängigen CD4-unabhängigen ⁸⁷ oder CD4-abhängigen ⁹³ Abstoßungsprozesses ist: Der T-Zellrezeptor auf CD8+ T-Zellen kann das MHC-Klasse-I-Peptid auf allogehen Leberzellen erkennen und vermittelt über co-stimulatorische Signale von CD4+ T-Zellen die Entwicklung von CD8+ T-Zellen zu alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen ⁸⁶. Auf der anderen Seite wird die CD4-abhängige Zerstörung der Hepatozyten bei Abwesenheit von CD8+ Zellen über alloreaktive Antikörper realisiert ⁹⁴. Interessanterweise sind die Immunmechanismen bei Abstoßung allogener Leberzellen andere als jene bei allogehen Inselzell- oder Herztransplantaten, wo die Abstoßung allein über den CD4-abhängigen Weg vermittelt wird ⁸⁶. Zusätzlich betonen *Wesolowska et al.* in ihrer Arbeit, dass das angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Abstoßungsreaktion spielt, da nach Eliminierung von Natürlichen Killerzellen (NK) eine frühe Dysfunktion der transplantierten Leberzellen verhindert werden konnte ⁹⁵. Bei Mäusen, die allogene Leberzellen erhielten, wurden 1-3 Tage nach Transplantation Granulozyten, NK und Makrophagen in der Umgebung von sich integrierenden Hepatozyten gefunden ⁸⁵. *In vitro* führt die Co-Kultur von Granulozyten und syngenen Hepatozyten durch zytotoxische Reaktionen zur Lyse letzterer. Monozyten erzielen einen vergleichbaren, wenn auch weniger

ausgeprägten Effekt⁹⁶. Mehr als 70 % der transplantierten Leberzellen sollen durch diese frühe Immunantwort des angeborenen Immunsystems bereits zerstört werden³⁹.

Die Immunmechanismen nach Hepatozytentransplantation sind komplex und weitestgehend noch nicht verstanden. Die Immunabwehr ist (noch) wehrhaft und erfordert weitere Studien, um wegweisende Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu gewinnen.

2.4 Fragestellung

Zur Erfolgs- und Qualitätskontrolle sowie zum Ausschluss einer unerwünschten Akkumulation der transplantierten Zellen außerhalb des Zielorgans ist eine nicht-invasive Methode zur Detektion der Leberzellen bezüglich Lokalisation, Integration und Langzeitüberleben erforderlich. Die MRT-Technik zur *in vivo* Visualisierung nach Transplantation der *in vitro* markierten Hepatozyten mit Eisenoxidpartikeln (MPIOs) scheint derzeit eine vielversprechende Methode darzustellen. Wenig beleuchtet ist bis dato jedoch die Auswirkung der nano- bis mikrometergroßen paramagnetischen Eisenoxidpartikel auf das Rezipienten-Immunsystem, da nach jetzigem Kenntnisstand die Leberzelltransplantation ohnehin nicht ohne immunsuppressiven Schutz durchgeführt werden kann. Zur weiteren Etablierung dieser neuen Nachweismethode von transplantierten Hepatozyten ist es aber nötig, den Einfluss der Eisenoxidmarkierung der Leberzellen auf ihre immunogenen Eigenschaften zu untersuchen und negative Effekte auszuschließen. Eine weitere Bedingung für den erfolgreichen Schritt vom Forschungslabor zur Patientenanwendung sind Modelle, die der menschlichen Anatomie, Biochemie und Physiologie nahe kommen, wie es im Großtiermodell Schwein gegeben ist. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem immunogenen Potential von MPIOs bei konstanter Immunsuppression durch Analyse der Immunantwort des Empfängers nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten im Vergleich zur Immunreaktion nach Transplantation naiver Hepatozyten und isolierter MPIOs im Großtiermodell Schwein. Parallel soll die Evaluierung der Applikationsrouten via A. gastroepiploica, Milzparenchym und Pfortader aus immunologischer Sicht erfolgen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- ∞ Kommt es nach Transplantation MPIO-markierter porciner Hepatozyten in Leber und Milz trotz Immunsuppression zu einer Aktivierung des

Empfängerimmunsystems und ist diese stärker als jene nach Transplantation naiver Hepatozyten?

- ∞ Lösen die Applikationsrouten A. gastroepiploica, Milzparenchym und Pfortader unterschiedliche Immunantworten aus und sollte einer der genannten Applikationswege aus immunologischer Sicht bevorzugt werden?
- ∞ Haben isolierte MPIO-Partikel ein immunogenes Potential?

Um die genannten Aspekte im richtigen Kontext werten zu können, ist es wichtig, die Immunogenität primärer porciner Hepatozyten zu untersuchen und das etwaige Ausbleiben einer Immunantwort wegen möglicher geringer Immunogenität der Leberzellen nicht als Unbedenklichkeitsnachweis der MPIOs fehlzudeuten.

- ∞ Regulieren porcine Hepatozyten nach Zytokinstimulation mit $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, wie sie regelhaft während einer Immunreaktion ausgeschüttet werden, ihre MHC I- und MHC II-Moleküle hoch, so dass sie durch die vermehrte Präsentation ihrer allogenen Peptide für das Empfängerimmunsystem erkennbar werden?
- ∞ Ist ein dosisabhängiger Einfluss nachweisbar?

3. Material und Methoden

3.1 Materialliste

Die Auflistung der verwendeten Materialien erfolgt jeweils in alphabetischer Reihenfolge.

3.1.1 Reagenzien

Reagenz	Hersteller
Aqua dest: RNase- und DNasefrei	Gibco by Life Technologies Co., USA
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
CaCl ₂ 2H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Biochrom AG, Berlin
DMSO: Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethanol: 70%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
FCS (Fetales Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
HBSS: Hanks` Balanced Salt Solution	Biochrom AG, Berlin
Hepes Buffer	Merck KGaA, Darmstadt
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems by Life Technologies Co., USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kcl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kollagenase P	Roche, Mannheim
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Mastermix: TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems by Life Technologies Co., USA
MgSO ₄ 2H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt
MPIO (micron-sized particles of iron oxide)	Bangs Laboratories, USA
NaCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Pyruvat	Biochrom AG, Berlin

Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline	PAA, Österreich
RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
Trizol® LS Reagent	Invitrogen by Life Technologies Co., USA
Trypanblau: 0,4%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
Williams Medium E	Biochrom AG, Berlin
Williams Medium E Waschmedium	Genaxxon Biosciences, Biberach

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Auslaufpipetten Falcon® 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml	BD Biosciences, USA
Blutentnahmekanüle BD Vacutainer®	BD Biosciences, USA
Blutentnahmeröhrchen BD Vacutainer®	BD Biosciences, USA
Darmrohr	Ratiomed®, Megro, Wesel
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
FACS-Röhrchen Falcon® 5 ml	BD Biosciences, USA
Falcon® Röhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences, USA
Filter Tips: FT 100 und FT 10E	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filter Tips Biosphere® 2-200µl und 100-1000µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Gasfilter: Sartorius Minisart®	Sartorius AG, Göttingen
Kryoröhrchen: 1,6 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MicroAmp® Optical Tube 0,2 ml	Applied Biosystems by Life Technologies Co., USA
MicroAmp® Optical 8-Cap Strip	Applied Biosystems by Life Technologies Co., USA

MicroAmp® Cap Installing Tool	Applied Biosystems by Life Technologies Co., USA
Neubauerzählkammer	Brand Gläser, Wertheim
Perfusorspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Prolene 3-0 (resorbierbar)	Ethicon Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Reaktionsgefäß: 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße: 0,6 ml und 1,6 ml, RNase-, Dnasefrei	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Tabotamp®	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Venenverweilkatheter Braunüle® 18G, 20G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Vicryl® 3-0, 5-0 (resorbierbar)	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Zellkulturflasche Falcon® (A=175cm ²)	BD Biosciences, USA
Zellkulturplatte Falcon® (12 well, 24 well)	BD Biosciences, USA
Zentraler Venenkatheter Certofix® Trio: 16G, 18G, 18G	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

3.1.3 Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Begasungssystem	DASGIP AG, Jülich
Durchflusszytometer: BD FACSCalibur™	BD Biosciences, USA
Durchflusszytometrie: Software CellQuest Pro	BD Biosciences, USA
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Excel® 2008 für Mac	Microsoft® Inc., USA
FlowJo Version 8.8.6.	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism Version 6.0	GraphPad Software, Inc., USA
Mikroskop: Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Real Time PCR System 7500	Applied Biosystems, USA
Real Time PCR Systems 7500 SDS	Applied Biosystems, USA

Software	
Sauger: Vacusafe Biosciences	Integra Biosciences AG, Schweiz
Spektralphotometer: Nano Drop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilbank: LaminAir® HBB 2448	Heraeus Instruments, Hanau
Stickstofftank: Arpege 55	Air Liquide Medical GmbH, Düsseldorf
Thermal Cycler: MJ Research PTC-200	GMI Inc., USA
Vortexer: Vortex-Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Köttermann GmbH & Co. KG Labortechnik, Uetze
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific Inc., USA

3.1.4 Lösungen und molekularbiologische Produkte

Puffer und Lösungen

- Calciumfreie Lösung
- DMSO-Lösung: 80% FCS, 20% DMSO
- FACS-Puffer: PBS, 2% FCS, 0,1% Na-Acid
- Kollagenlösung: Kollagenfertiglösung + PBS 1:50
- Kollagenasepuffer: Kollagenasestammlösung + 400 mg Kollagenase P steril filtriert; anschließend Calcium und Magnesium hinzugefügt
- Paraformaldehydlösung: 5 g Paraformaldehyd in 400 ml PBS über Nacht bei 50°C mittels Magnetrührer gelöst, auf pH 7,4 eingestellt und mit PBS auf 500 ml aufgefüllt
- RPMI-Lösung: RPMI 1640, 5 % Hapes, 1% Streptomycin/Penicillin, 1% L-Glutamin, 1 % Natrium-Pyruvat
- Williams Medium E supplementiert: 1 M Insulin, 1 M Dexamethason/Fortecortin, 100 U/ml Penicillin G, 40 g/ml Gentamycin, 100 g/ml Vancomycin, 2 g/ml Fluconazol, 1 mM Natrium-Pyruvat, 15 mM N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethan-Schwefelsäure-Puffer (HEPES), 4 mM L-Glutamin und 50 ml 10%-iges fetales Kälberserum (FCS)

Zytokine

- INF γ Recombinant Swine, Fa. Gibco® by Life Technologies Co., USA
- Tumor Necrosis Factor α Recombinant Swine, Fa. Gibco® by Life Technologies Co., USA

Primärantikörper

Antigen	Spezies	Fluoreszenz	Hersteller
CD3 epsilon	Maus, monoklonal, anti-pig	Biotin	Abcam, UK
CD4a	Maus, monoklonal, anti-pig	PE	BD Biosciences, USA
CD25	Maus, monoklonal, anti-pig		AbD Serotec, USA
HLA DR + HLA DP (MHC II)	Maus, monoklonal, anti-pig	FITC	Abcam, UK
IgG2a (Isotypkontrolle)	Maus, monoklonal	PE	BD Biosciences, USA

Sekundärantikörper

Antigen	Spezies	Fluoreszenz	Hersteller
IgG1	Ratte, anti-mouse	PerCP	BD Biosciences, USA

Second Step Reagent

- APC Streptavidin, Fa. BD Biosciences, USA

Primer

Gen	Assay ID	Hersteller
HPRT1	Ss03388274_m1	TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems by Life Technologies Co., USA
SLA-6 (MHC I)	Ss03389934_m1	
SLA-DRA (MHC II)	Ss03389945_m1	

3.1.5 Medikamente

Medikament	Hersteller
Baytril®	Bayer Animal Health, Monheim
Draxxin®	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Fentanyl	TAD Pharma GmbH, Cuxhaven
Fluconazol	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Fortecortin	Merck KGaA, Darmstadt
Gentamycin	BioWhittaker Europe, Essen

Heparin	Ratiopharm, Ulm
Insulin	Biochrom AG, Berlin
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
M+Pac®	MSD Animal Health GmbH, Schwabenheim
Novaminsulfon®	Vetoquinol GmbH, Ravensburg
Paspertin®	Solvay Arzneimittel GmbH, Hannover
Penicillin/ Streptomycin	Gibco, GB
Ranitic®	Hexal AG, Holzkirchen
Rompun®	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Sandimmun®	Novartis, Nürnberg
Solu-Decortin®	Merck KGaA, Darmstadt
Stresnil®	Janssen Animal Health, Johnson & Johnson, Neuss
Tazobac®	Pfizer Pharma GmbH, Berlin
Temgesic®	Essex Pharma GmbH, München
Urbason® soluble forte	Sanofi, Frankreich
Ursotamin®	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Vancomycin	Abott Deutschland, Ludwigshafen

3.2 Versuchsablauf: Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten im Großtiermodell Schwein

Zur Isolierung der Leberzellen erfolgte die Explantation der Leber von Hausschweinen. Die isolierten Leberzellen einer Leber wurden jeweils 3-4 Minipigs transplantiert. Dabei gab es 3 Experimentalgruppen: Die erste Gruppe von Tieren erhielt MPIO-markierte Hepatozyten, eine zweite erhielt native Hepatozyten und die dritte Gruppe isolierte MPIO-Partikel. In der ersten und zweiten Experimentalgruppe wurden die Tiere die Applikationsroute betreffend in weitere Untergruppen unterteilt: A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae. Isolierte MPIO-Partikel wurden nur über die A. gastroepiploica infundiert (Abb. 1).

Leberzelltransplantation **MPIO-**markierter Hepatozyten

Leberzelltransplantation **nativer** Hepatozyten

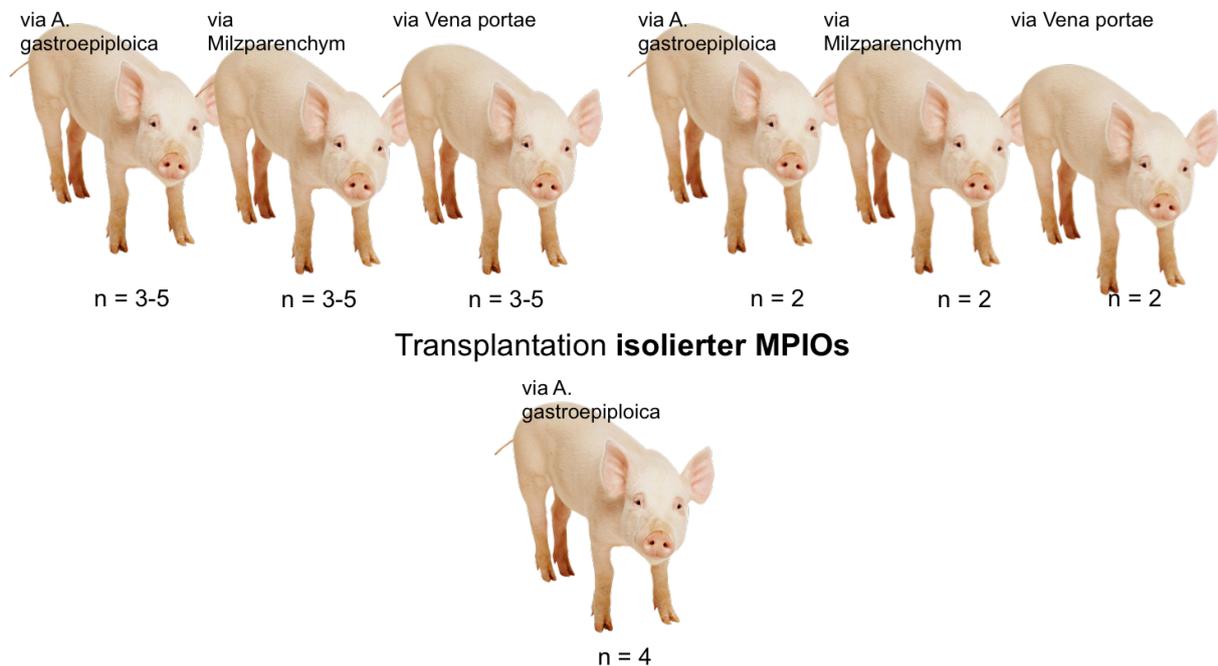


Abbildung 1: Studiendesign. Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, nativer Hepatozyten und isolierter MPIO-Partikel über die Applikationsrouten A. gastroepiploica, Milzparenchym und Pfortader. Angegeben ist die Anzahl (n) von Tieren pro Gruppe.

3.3 Leberzellisolierung

3.3.1 Spendertiere

Nach Genehmigung der geplanten Tierversuche durch die Tierversuchskommission durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Genehmigungsnummer: G0110/08) wurden die Tiere unter standardisierten Bedingungen in der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow-Klinikum der Charité gehalten und versorgt.

Die Lebern zur Isolierung der Hepatozyten stammten von 8 männlichen Hausschweinen der Landrasse (Tierhandlung Wolfgang Günther, Neuenhagen). Sie waren 8 Wochen alt und wogen 15-20 kg.

3.3.2 Leberzellisolierung

Nach Explantation der Leber⁹⁷ erfolgte die Isolierung der Hepatozyten auf der Grundlage eines modifizierten Protokolls von van de *Kerkhove* et al.⁹⁸ unter sterilen Bedingungen in einer Sterilarbeitsbank. Calciumfreie Lösung und kurz vor Isolierung angesetzter Kollagenasepuffer wurden im Wasserbad auf 37° C erwärmt. Über ein in

der Vena portae liegendes Darmrohr, das während der OP platziert wurde, konnte der Anschluss an einen Perfusionskreislauf geschaffen werden. Darüber wurde die Leber zunächst zur Lösung der Zell-Zell-Kontakte mit 2000 ml calciumfreier Lösung bei einer Flussrate von 200 ml/min durchspült und anschließend mit 800 ml Kollagenasepuffer (150-200 ml/min) über ein zweites Schlauchsystem perfundiert. Die Oxygenierung der Lösungen wurde durch einen Gasfilter realisiert (95% O₂, 5% CO₂). Nach ca. 10-15 min war der Verdauvorgang abgeschlossen und wurde mittels 750 ml 4°C-kalter Hanks-Pufferlösung gestoppt. Nach manueller Lösung der Zellen und ihrer Filtration mittels Gaze in 50ml Falcon-Röhrchen folgte die Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 1, Zentrifugalbeschleunigung 50 g, Dauer 3 min, Temperatur 4° C). Das Zellsediment wurde in 100 ml Williams-Medium-E-Waschmedium resuspendiert. Zentrifugations- und Waschvorgang wurden anschließend 2x wiederholt. Daraufhin wurde das Zellgesamtvolumen von 300 ml in supplementiertem Williams-Medium-E aufgenommen. Die Quantifizierung und Vitalitätsbestimmung erfolgte mittels Trypanblau lichtmikroskopisch in einer Neubauerzählkammer. Danach wurde die Konzentration auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und jeweils 9 ml Zellsuspension in Zellkulturflaschen (A=175 cm²) ausgesät. Diese waren zur Adhäsionsverbesserung bereits zuvor mit Kollagenlösung 1:50 beschichtet und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert worden. Die Zellsuspension in den Kulturflaschen wurde mit jeweils 9 ml supplementiertem Williams-Medium-E aufgefüllt. Nach 18-stündiger Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und pro Kulturflasche mit 9 ml frischem supplementiertem Williams-Medium-E versorgt.

3.3.3 MPIO-Markierung der Leberzellen *in vitro*

Die Markierung der Leberzellen erfolgte mit superparamagnetischen 1,6 µm großen Eisenoxidpartikeln, die einen durchschnittlichen Eisengehalt von ca. 1,1 pg/Partikel aufwiesen. Sie wurden mittels supplementiertem Williams-Medium-E in einer Konzentration von 60×10^6 Partikel/ml in Lösung gebracht, wovon jeweils 9 ml in die Zellkulturflaschen gegeben wurden. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurden die Leberzellen, die einen Großteil der Partikel über Endozytose aufgenommen hatten, 3x mit jeweils 10 ml PBS gewaschen. Um den markierten Zellrasen von seiner Adhäsionsfläche zu lösen, wurde in jede Zellkulturflasche 10 ml warme Trypsin-EDTA-Lösung gegeben. Eine 4-minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank folgte. Die Zugabe von 10 ml 4°C-kaltem supplementiertem Williams-

Medium-E stoppte die enzymatische Aktivität des Trypsins. Nach Überführen der Zellsuspension in Falcon-Röhrchen und Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 50 g, Dauer 3 min, Temperatur 4° C) wurde der Überstand abgenommen und die Zellen wurden in 4°C-kaltem PBS resuspendiert. Quantifizierung und Viabilitätsprüfung mittels Trypanblau schlossen sich an. Pro Empfängertier wurde das Zellsediment aus 18 Falcon-Röhrchen, in 30 ml PBS gelöst, in eine Perfusorspritze überführt. Diese wurde bis zur Applikation bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.4 Leberzelltransplantation

3.4.1 Empfängertiere

Als Empfängertiere der Leberzelltransplantation wurden 18 Monate alte weibliche *mini-pigs* mit einem Gewicht von 25-31 kg gewählt. Bezugsquelle war die Firma Ellegaard Göttingen Minipigs A/S in Dänemark.

3.4.2 Medikation

Alle Empfängertiere erhielten 2 Wochen präoperativ eine Impfung gegen *Mycoplasma hypopneumoniae* (M+Pac), den am weitesten verbreiteten Krankheitserreger des Schweins. Die antibiotische Prophylaxe umfasste 2,5 mg/kg/KG Tulathromycin i.m. (Draxxin® 10%) 2 Wochen vor LCT, intraoperativ einmalig Piperacillin und Tazobactam 4,5 mg i.v. (Tazobac®) und im Verlauf Enrofloxacin 10% (Baytril®). Erstmalig 2 Tage vor LCT und im weiteren Verlauf erfolgte die Gabe von 2-2,5 mg/10kg/KG Metoclopramid p.o. (Paspertin®) zur Steigerung der Magen-Darm-Motilität und antiemetischen Prophylaxe. Als Schmerztherapie diente die transdermale Anwendung von Fentanyl-Pflaster 75 µg/h (TAD®), Buprenorphin 0,3 mg/ml (Temgesic®) und Metamizol 2,5 mg/5ml (Novaminsulfon®). Ranitidin 150mg (Ranitic®) wurde als Magenschutz ins Futter gemischt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medikamente an OP- und Blutentnahmetagen in Narkose i.v. oder i.m. und an den restlichen Tagen i.m. oder p.o. verabreicht (Tab. 1).

Die Gabe der Immunsuppressiva Ciclosporin A 0,05 ml/kg/KG p.o. (Sandimmun®) und Prednisolon 0,5 mg/kg/KG p.o. (Solu-Decortin®/ Decortin H®) zweimal täglich erfolgte erstmalig 2 Tage vor LCT und wurde in diesem Rhythmus fortgesetzt (Tab. 1). Entweder wurden den Tieren die Medikamente ins Maul gespritzt oder sie erhielten sie über Nahrungsvektoren. An OP- und Blutentnahmetagen belief sich die

tägliche CicloporinA-Dosis unter Narkose auf 0,2 ml/kg/KG i.m. und die Prednisolon-Dosis auf 1 mg/kg/KG i.v.. Darüber hinaus erhielten die Tiere am Tag der Leberzelltransplantation Methylprednisolon-21-Hydrogensuccinat 250 mg i.v. (Urbason® soluble forte). Die CiclosporinA-Dosis wurde nach Blutspiegelbestimmung am 2. postoperativen Tag individuell angepasst.

Tag	Metoclopramid 10mg/2ml	Enrofloxacin 10% oder 50 mg	Fentanyl 75 µg/h	Buprenorphin 0,3mg/ml	Metamizol 2,5mg/5ml	Ranitidin 150mg	CiclosporinA Saft:100mg/ml Injektionslg: 50mg/ml	Prednisolon 25mg/ml 10mg/Tbl.
-2	2 Gtt. p.o.						2x tgl. 0,05ml/ kg/KG p.o.	2x tgl. 0,5mg/kg p.o.
-1	2 Gtt. p.o.						2x tgl. 0,05ml/kg/KG p.o.	2x tgl. 0,5mg/kg p.o.
0 OP BE	1ml i.v.		kleben	1ml s.c.	1ml i.v.		0,2ml/kg/KG i.m.	1mg/kg/KG i.v.
1	1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m.		1ml i.m.	1ml i.m.		2x tgl. 0,05ml/ p.o.	2x tgl. 0,5mg/kg p.o.
2 BE	1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m.	kleben	1 ml i.v.	1ml i.m.		0,2ml/kg/KG i.m.	1mg/kg/KG i.v.
3	2 Gtt. p.o. oder 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. oder 50- 75mg p.o.		bei Bedarf i.m.	1g p.o.	gemör- sert in Futter	2x tgl. nach Spiegel p.o.	2x tgl. 0,5mg/kg p.o.
4	2 Gtt. p.o. oder 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. oder 50- 75mg p.o.		bei Bedarf i.m.	1g p.o.	gemör- sert in Futter	2x tgl. nach Spiegel p.o.	2x tgl. 0,5mg/kg p.o.
5	2 Gtt. p.o. oder 1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m. oder 50- 75mg p.o.			1g p.o.	gemör- sert in Futter	2x tgl. nach Spiegel p.o.	2x tgl. 0,5mg/kg p.o.
...								
14 BE FI	1ml i.m.	0,5-0,75ml i.m.			bei Bedarf	gemör- sert in Futter	nach Spiegel i.m.	1mg/kg/KG i.v.

Tabelle 1: Medikamentenplan. OP = Tag der Leberzelltransplantation; BE = Blutentnahme; FI = Finalisierung = Sektion der Tiere

3.4.3 Zelltransplantation

Die Tiere wurden nach einem Standardprotokoll der Forschungseinrichtung für experimentelle Chirurgie (FEM) der Charité im Nüchternzustand mit 4,8-5,3 ml Xylazin i.m. (Rompun®), 7,6-8,6 ml Ketamin i.m. (Ursotamin®), 3 ml Azaperon i.m. (Stresnil®) und 0,5-0,8 ml Atropin 1% i.m. prämediziert. Die Narkose wurde mit 2-7

mg/kg Propofol 1% i.v. eingeleitet und mit Isofluran 0,8-1,2% über mechanische Ventilation und Fentanyl i.v. (1-3 µg/kg als Bolus und 1-4 µg/kg/h) aufrechterhalten. Der Zugang zu Leber bzw. Milz gelang über eine mediane Laparotomie. Alle Empfängertiere erhielten 30 ml einer Zell- bzw. Partikelsuspension. Blutungen wurden bei Bedarf mittels Bipolarpinzette koaguliert, mit Tabotamp® verklebt oder übernäht (Vicryl 3-0, 5-0). Die Bauchdecke wurde mittels Fasziennaht (Vicryl 1 Plus), Subkutannaht (Vicryl 2-0) und Hautnaht (Prolene 3-0) verschlossen und die Wunde steril versorgt. Postoperativ wurden die Tiere mit Rotlicht gewärmt und fürsorglich überwacht. Nach MRT- und Blutuntersuchungen erfolgte die Finalisierung der Schweine am 14. postoperativen Tag mittels Kaliumchloridlösung. Post mortem wurden Leber, Milz, Nieren, Herz und Lungen entnommen und Gewebeproben für die histologische Aufarbeitung gewonnen.

3.4.3.1 Applikation via Arteria gastroepiploica

5 Tiere erhielten MPIO-markierte Hepatozyten, 2 Tiere nicht-markierte native Hepatozyten und 4 Tiere isolierte MPIOs über die A. gastroepiploica infundiert. Die gastroepiploischen Gefäße wurden freipräpariert, die Venen ligiert und abgesetzt und die Arterie doppelt angeschlungen (Vicryl 3-0), wobei der distale Teil ligiert wurde und der proximale offen blieb. Die Arterie wurde eröffnet und ein Venenverweilkatheter (18 G) platziert, über den die Milz mit 250 ml NaCl-Heparin-Lösung (5000 I.E. Heparin 1:2500 verdünnt) gespült wurde. Während A. und V. lienalis abgeklemmt wurden, erfolgte die Zell- bzw. Partikelapplikation 3 min retrograd über die A. gastroepiploica. Nach Spülung mit 15 ml NaCl wurde die Klemme entfernt, die A. gastroepiploica dekanüliert und der proximale Teil ligiert. Bauchdeckenverschluss und postoperative Versorgung erfolgten wie oben beschrieben.

3.4.3.2 Applikation via Milzparenchym

5 Tieren wurden MPIO-markierte Leberzellen und 2 Tieren nicht-markierte Hepatozyten via intrasplenische Injektion verabreicht. Die gastroepiploischen Gefäße wurden aufgesucht und abgeklemmt. Mittels einer Kanüle (20 G) erfolgte die Injektion von jeweils 10 ml Zellsuspension auf Höhe der A. gastroepiploica einmal in kaudaler Ausrichtung und einmal in apikaler Orientierung und von 10 ml in den apikalen Milzpol. Nach Spülung mit 15 ml NaCl wurde die Klemme entfernt. Die Bauchdecke wurde verschlossen und die Wunde steril versorgt.

3.4.3.3 Applikation via Vena portae

5 Tiere erhielten MPIO-markierte Hepatozyten und 2 Tiere nicht-markierte Hepatozyten in die Pfortader injiziert. Dafür wurde die V. portae dargestellt, eröffnet und mittels eines dreilumigen Zentralen Venenkatheters kanüliert. Über einen Schenkel wurde die Zellsuspension 5 min lang appliziert, während über einen anderen 30 ml einer NaCl-Heparin-Lösung (5000 I.E. Heparin 1:300 verdünnt) infundiert wurden. Der Katheter wurde entfernt und die Pfortader mit einer vorher gesetzten Tabaksbeutelnaht (Vicryl 5-0) verschlossen. Bauchdeckenverschluss und postoperative Versorgung erfolgten wie oben beschrieben.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Blutentnahme

Zur Analyse der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) im unbehandelten Zustand der Empfängerschweine erfolgte die Blutentnahme 8 Tage vor LCT (Tag -8). Um eventuelle Veränderungen des Immunstatus durch die Wirkung der verabreichten Immunsuppression aufzudecken, wurde erneut Blut am Tag der OP (Tag 0), aber noch vor LCT, abgenommen. Postoperativ folgten Blutentnahmen an den Tagen 2, 7 und 14 (Abb. 2). Zur Durchführung der Blutentnahmen an den Tagen -8, 0, 7 und 14 wurden die Tiere narkotisiert. Die Narkose war jeweils für eine sich anschließende MRT-Untersuchung notwendig und wurde wie unter 2.3.3 beschrieben umgesetzt. Am 2. postoperativen Tag hingegen wurden die Schweine mittels 4,8-5,3 ml Xylazin i.m. (Rompun®), 7,6-8,6 ml Ketamin i.m. (Ursotamin®) und 3 ml Azaperon i.m. (Stresnil®) sediert.

Blutproben zur Blutspiegelbestimmung von Ciclosporin A, AST, ALT, Harnstoff und Albumin wurden jeweils zusätzlich abgenommen.

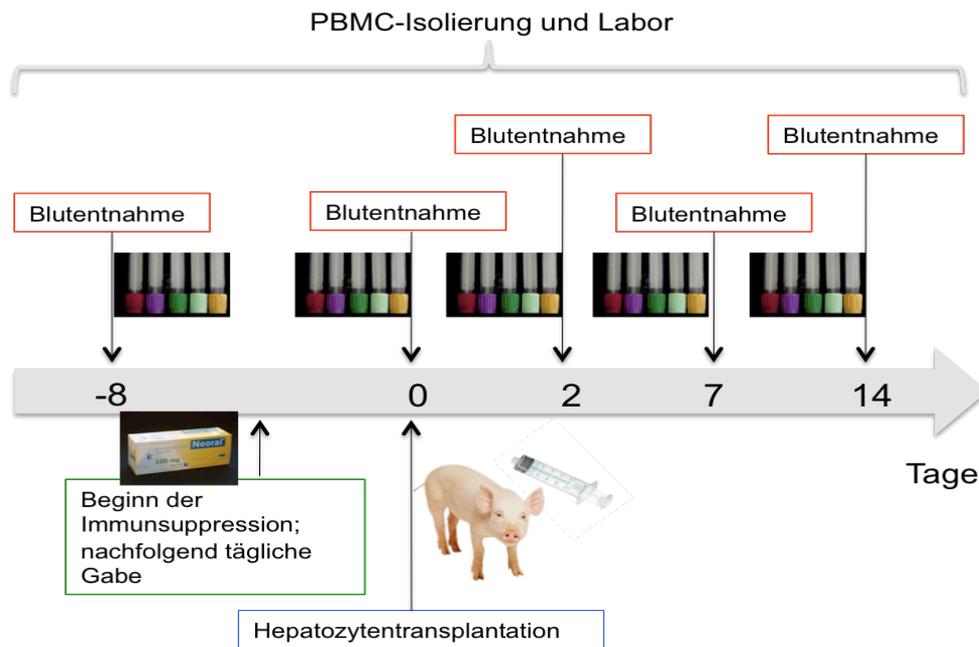


Abbildung 2: Zeitliche Abfolge von Blutprobengewinnung für die PBMC-Isolierung und Laboranalyse, Beginn der Immunsuppressionsgabe und Hepatozytentransplantation.

3.5.2 PBMC-Isolierung

Die Blutproben wurden jeweils aus zwei 6ml-Heparinröhrchen in ein steriles 50ml-Falcon-Tube überführt und mit PBS 1:1 bis 1:2 verdünnt. Bei 20 ml verdünntem Blut wurde ein Gradient, bei 30 ml verdünntem Blut wurden 2 Gradienten je Falcon-Tube gegossen. Dafür wurden je nach Gesamtvolumen mehrere neue Falcon-Tubes mit jeweils 15 ml Biocoll Separating Solution befüllt und darauf 15–20 ml verdünntes Blut gegeben, um durch eine anschließende Gradientenzentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 1, Zentrifugalbeschleunigung 650 g, Dauer 30 min, Raumtemperatur) einen Lymphozytenring in der Interphase zu erzeugen, der mit einer Pipette abgenommen und in ein frisches 50ml-Falcon-Tube überführt wurde. Nach Auffüllung mit PBS auf 50 ml erfolgte eine weitere Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 250 g, Dauer 10 min, Raumtemperatur). Danach wurde der Überstand abgenommen, 30 ml PBS dazugegeben und bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 5 ml RPMI-Lösung resuspendiert und in ein neues 15ml-Falcon-Tube überführt und auf Eis gelagert. Zur Quantifizierung wurden ca. 0,1 ml pro Falcon-Tube in ein Eppendorf-Gefäß überführt, in einem weiteren wurde die Zelllösung im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt, mit Hilfe des Haemocytometers gezählt und die Zellzahl errechnet. Als vitale Zellen galten nicht

gefärbte Zellen, da diese über eine intakte Membran verfügen, durch die der Farbstoff nicht in die Zelle eindringen kann. Nach Auszählen der 4 Quadrate ergaben sich auf Grundlage der folgenden Formel die jeweiligen Zellzahlen für vitale und tote

$$\text{Zellen: } \frac{\text{Anzahl der Zellen}}{4} \times 1,5 \times 10^4 = \text{Zellen in Suspension} \frac{\text{Zellen}}{\text{mL}}$$

Zuletzt schloss sich die Zentrifugation der Falcon-Tubes an (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 250 g, Dauer 10 min, Temperatur 4°C). Zum Einfrieren der Zellen wurde der Überstand abgesaugt, pro 10 Millionen Zellen 0,5 ml RPMI-Lösung dazugegeben und die Zellen darin resuspendiert, jeweils 0,5 ml in ein Kryoröhrchen überführt und darauf langsam 0,5 ml 20%-ige DMSO-Lösung getropft. Schließlich wurden die Kryoröhrchen in einer vorgekühlten Styroporbox für eine Stunde bei -20°C, über Nacht bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in den Stickstofftank gestellt.

3.5.3 Oberflächenfärbung und FACS-Analyse

Die Oberflächenfärbung der Zellen erfolgte zur Untersuchung im Fluoreszenz-aktivierten Zellsorter (FACS) mit den Antikörpern anti-CD3ε-AK, anti-CD4-AK, anti-CD25-AK und anti-MHCII-AK.

CD3ε erlaubt über die Antikörperbindung die Selektion der T-Zellen von den mononukleären Zellen im Durchflusszytometer. Über die Verwendung eines anti-CD4-AKs gelingt die differenzierte Betrachtung der Verteilung von Helfer- und zytotoxischen T-Zellen. CD25 als alpha-Kette des Interleukin-2-Rezeptors, dessen Synthese von aktivierten T-Zellen induziert wird, dient als Aktivierungsmarker. Ebenso kann über die Verwendung eines anti-MHCII-AKs die Expression von MHC II auf mononukleären Zellen beleuchtet werden. Zusätzlich wurde die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) bestimmt. Diese gibt Auskunft über einen Anstieg oder eine Abnahme der Expression des untersuchten Antigens, also der relativen Expressionsdichte, die anzeigt, wie viel des Antigens die Zellen der Population im Mittel exprimieren.

Zum Auftauen der PBMC-Kryoröhrchen wurden diese im 37°C-Wasserbad erwärmt und noch vor Verschwinden der letzten Eisklumpen mit 1 ml warmer RPMI-Lösung tröpfchenweise versetzt. Nachdem die PBMC-Lösung in ein 15ml-Falcon-Tube überführt wurde, erfolgte die weitere Zugabe von 10 ml RPMI-Lösung. Es schloss sich eine Zentrifugation an (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5,

Umdrehung/min 1000 rpm, Dauer 4 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml FACS-Puffer gewaschen. Bevor eine weitere Zentrifugation folgte (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 300 g, Dauer 5 min, Temperatur 8°C), wurden die Zellen mittels Trypanblau gezählt. Nach Dekantieren und Schütteln mittels Vortexgerät wurde das Pellet je nach Zellzahl entsprechend mit FACS-Puffer verdünnt, um es auf 7 FACS-Röhrchen mit jeweils 500 000 Zellen in 0,1 ml zu verteilen, die wiederum nach Zugabe von jeweils 2 ml FACS-Puffer zentrifugiert wurden (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, 1200 U/min, Dauer 5 min, Temperatur 4°C). Die Röhrchen wurden dekantiert und mittels Vortexgerät geschüttelt. Es folgte die Zugabe der Antikörper zum einen als Einzelfärbung pro Röhrchen und zum anderen als Vierfachfärbung in einem Röhrchen. Das Volumen wurde per Titration ermittelt: 1 µl des anti-CD25-Antikörpers, 0,5 µl des anti-CD3ε-Antikörpers, 1 µl des anti-CD4-Antikörpers und 10 µl des anti-MHCII-Antikörpers. Ein ungefärbtes Röhrchen diente als Negativkontrolle und eines als Isotypkontrolle mit anti-mouse-IgG2a-AK zur Bestimmung unspezifischer Bindungen durch den Fc-Rezeptor. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen mit jeweils 2 ml FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (Einstellung unverändert). Der Überstand wurde abgegossen und die Röhrchen mittels Vortexgerät geschüttelt. Zum anti-CD25-Primärantikörper wurden 5 µl anti-mouse-IgG1-Sekundärantikörper und zum anti-CD3ε-Antikörper wurden 0,5 µl Streptavidin-Second-Step-Reagent gegeben und eine nochmalige Inkubation von 20 min bei 4°C folgte. Danach wurden die Zellen abermals mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, bei gleicher Einstellung zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Proben mittels Vortexgerät geschüttelt und mit jeweils 1 ml 1%-iger Paraformaldehydlösung fixiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die anschließende Analyse erfolgte im BD FACSCalibur™ unter Verwendung der CellQuestPro-Software. Dabei wurden die Zellpopulationen auf Grund ihrer Größe mittels Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), auf Grund ihrer Granularität mittels 90°-Streulicht (*sideward-scatter*, SSC) und auf Grund der Fluoreszenzeigenschaften der Antikörper unterschieden. Für die Datenauswertung wurde mit dem Programm FlowJo gearbeitet.

3.6 *In vitro* Versuche zur Immunogenitätsuntersuchung porciner Hepatozyten

Als kernhaltige Zellen exprimieren Hepatozyten das Oberflächenmolekül MHC I. Dieses Alloantigen dient für das Empfängerimmunsystem als geeignetes Erkennungsmerkmal, um eine Immunkaskade gegen die transplantierten Hepatozyten einzuleiten. Man weiß, dass Zytokine wie $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ die Expression der MHC I-Moleküle auf Zellen verstärken und die MHC II-Expression bei Zellen induzieren können, die bisher keine MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche getragen haben. Mit dem folgenden Versuchsaufbau sollen porcine Hepatozyten auf ihre Ausgangsexpression von MHC I- und MHC II-Molekülen und deren Expressionsverhalten durch Zytokinstimulation untersucht werden, um die Immunogenität von porcinen Hepatozyten beurteilen und etwaige immunologische Reaktionen nach Transplantation MPIO-markierter porciner Hepatozyten verstehen und erklären zu können. Dafür wurden die isolierten (nicht-markierten) Hepatozyten in 24-well-Platten ausgesät und mit den Zytokinen $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ unterschiedlicher Konzentration stimuliert. Anschließend folgte die RNA-Isolierung. Die RNA wurde mittels der Reversen-Transkriptase-Reaktion in cDNA umgeschrieben, um in der anschließenden TaqMan-PCR das Ausmaß der MHC I- und MHC II-Transkription zu analysieren und zu vergleichen. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden detailliert beschrieben.

3.6.1 Zellkultur und Stimulation mit Zytokinen

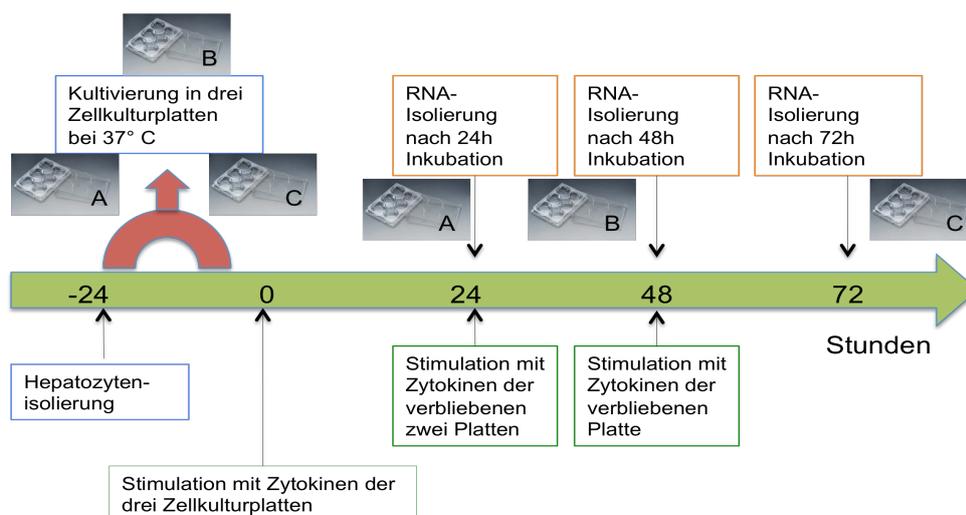


Abbildung 3: Zeitliche Abfolge von Hepatozytenstimulation mit den Zytokinen $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$ und anschließender RNA-Isolierung.

Für das Aussäen der Zellen wurden drei 24-well-Platten mit Kollagen beschichtet, das nach kurzer Einwirkzeit abgesaugt wurde. Danach wurde pro Vertiefung 500 μl

supplementiertes Williams-Medium-E hinzugefügt. Bei einer Konzentration von 1 Million Hepatozyten pro 1 ml Zellsuspension wurde in jede Vertiefung 500 µl 1:1 mit Medium verdünnte Zellsuspension gegeben. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit frischem supplementiertem Williams-Medium-E versorgt. Anschließend wurden in jeweils eine Vertiefung aller 3 Platten 500 µl von INF γ 10 ng/ml, INF γ 100 ng/ml, TNF α 10 ng/ml, TNF α 100 ng/ml, INF γ 10 ng/ml + TNF α 10 ng/ml und INF γ 100 ng/ml + TNF α 100 ng/ml gegeben. Jeweils eine Vertiefung pro Platte diente als Negativkontrolle – dort wurden keine Zytokine hinzugefügt. Die drei Platten wurden abermals für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte aus den Vertiefungen einer Platte nach Absaugen des Mediums die RNA-Isolierung mittels TRIzol® LS Reagent. Diese Proben dienten zur Beurteilung der MHC-Expression nach 24-stündiger Inkubation mit INF γ und TNF α in den genannten Konzentrationen. Die anderen beiden Platten wurden wiederum 2x mit PBS gewaschen, mit 500 µl supplementiertem Williams Medium E und 500 µl Zytokin pro Vertiefung in gleicher Konzentrationsverteilung wie oben beschrieben versehen. Eine Vertiefung pro Platte diente wieder als Negativkontrolle. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank erfolgte die RNA-Isolierung einer Platte zur Beurteilung der MHC-Expression nach 48-stündiger Stimulation mit Zytokinen. Die dritte Platte wurde wie oben beschrieben behandelt und nach 72-stündiger Stimulationszeit schloss sich die RNA-Isolierung an (Abb. 3).

3.6.2 RNA-Isolierung

Zuerst erfolgte die Homogenisierung der Hepatozyten mittels 300 µl TRIzol® LS Reagent pro well einer 24-well-Platte bzw. 400 µl pro well einer 12-well-Platte durch mehrmaliges Resuspendieren und die Überführung des Hepatozyten-TRIzol®-Gemischs aus jeweils einer Vertiefung in jeweils ein beschriftetes RNase- und DNase-freies Eppendorf-Gefäß. Die Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 12000 g, Dauer 10 min, Temperatur 2-8°C) schloss sich an. Die im Überstand lokalisierte RNA wurde abgenommen und in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Separation folgte die Inkubation für 5 min bei 15-30°C, danach die Zugabe von 0,2 ml Chloroform pro 0,75 ml eingesetztem TRIzol®. Die Proben wurden vorsichtig verschlossen und für 15 sec per Hand geschüttelt, bevor sie abermals für 2-15 min bei 15-30°C inkubiert wurden. Nach einer erneuten Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5,

Zentrifugalbeschleunigung 12000 g, Dauer 15 min, Temperatur 2-8°C) stellten sich 3 Phasen dar, von denen die obere farblose wässrige Phase die RNA enthielt. Diese wurde in ein sauberes Gefäß überführt. Zur Präzipitation wurde die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro 0,75 ml eingesetztem TRIzol® gefällt. Nach Inkubation bei 15-30°C für 10 min und Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 12000 g, Dauer 10 min, Temperatur 2-8°C) formte die RNA ein gelartiges, nicht gut sichtbares Pellet am Boden und an den Seiten des Gefäßes. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75%-igen Ethanol pro 0,75 eingesetztem TRIzol® gewaschen. Es folgte das Vortexen der Proben und ihre Zentrifugation (Einstellung: Beschleunigung 9, Bremse 5, Zentrifugalbeschleunigung 7500 g, Dauer 5 min, Temperatur 2-8°C). Die Proben wurden dann in Ethanol bei -20°C gelagert oder ihre Ratio sofort im Spektralphotometer analysiert. Dafür wurde das Ethanol vollständig abgenommen und die Pellets 5-10 min nicht komplett luftgetrocknet. Im Anschluss daran wurden sie im RNase-freiem Wasser gelöst und resuspendiert und für 10 min bei 55-60°C inkubiert. Die Messung erfolgte bei A260/A280 nm mit einer Ziel-Ratio > 1,6.

3.6.3 Reverse Transkription

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits*. Nachdem die Komponenten auf Eis langsam auftauten, wurde das Volumen des Mastermixes für die benötigten Proben auf der Grundlage einer Reaktion berechnet und dieser wie folgt angesetzt: 2 µl RT-Buffer, 0,8 µl dNTP-Mix, 2 µl Random Primer, 1 µl MultiScribe Reverse Transcriptase und 4,2 µl nukleasefreies Wasser für jeweils eine RNA-Umschreibung. Der fertige Mix wurde vorsichtig gemischt und auf Eis gelagert. Daraufhin wurden pro Reaktion 10 µl Mastermix jeweils in ein RNase- und DNase-freies 0,6 ml-Reaktionsgefäß gegeben und dieser per Auf- und Abpipettieren mit der RNA (1 µg in 10 µl) vermischt. Die Gefäße wurden verschlossen, kurz zentrifugiert und bis zum endgültigen Beladen des Thermocyclers auf Eis gelagert. Dieser wurde folgendermaßen programmiert: 1. Stufe: 25°C, 10 min Dauer; 2. Stufe: 37°C, 120 min Dauer; 3. Stufe: 85°C, 5 sec Dauer; 4. Stufe: bei 4°C bis zu 24 h lagerbar.

3.6.4 TaqMan®-PCR

Die TaqMan®-PCR beruht auf dem Prinzip der PCR und ermöglicht durch Verwendung von Sonden eine zusätzliche Quantifizierung der gewonnenen DNA.

Eine PCR besteht aus einer Folge von Zyklen mit den Schritten Denaturierung, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese. Die Quantifizierung des PCR-Produktes wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Diese Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der PCR-Produkte zu. Die TaqMan-Sonden besitzen an einem Ende eine Reporter-Fluoreszenz und am anderen Ende einen Quencher, der die Fluoreszenz-Abgabe unterdrückt. Während eines PCR-Zyklus hybridisiert die Sonde mit dem komplementären DNA-Strang. In jedem Zyklus trifft nun die Taq-Polymerase auf ihrem Syntheseweg des Gegenstrangs auf diese Sonde, baut sie am 5'-Ende ab, so dass der Energietransfer vom Quencher auf den Reporter unterbrochen wird und letzterer nun seine Fluoreszenz abgeben kann, die während jedes Zyklus gemessen wird. Für die relative Quantifizierung wird ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen verwendet, in diesem Fall Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1), das regelmäßig amplifiziert wird und keiner Regulation unterliegt. Es dient zum Ausgleich der unterschiedlichen Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA. Über seine Amplifikation wird eine Referenzkurve geschaffen, auf die die zu untersuchenden Transkripte bezogen werden. Die Auswertung findet mit Hilfe des Ct-Werts statt, der auf Grund der Doppelwert-Bestimmung als Mittelwert der vom Gerät ermittelten HPRT-, MHC I- und MHC II-Cts gebildet wird. Der Ct-Wert beschreibt den Zyklus bzw. den Teil der Kurve, bei dem die Fluoreszenz am Anfang des exponentiellen Wachstums erstmalig statistisch signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Die MHC I- und MHC II-Kurven wurden in Bezug zur HPRT-Kurve gesetzt, um die Ct-Abstände zu ermitteln: $\Delta Ct = \text{Mittelwert Ct (MHC I bzw. MHC II)} - \text{Mittelwert Ct (HPRT1)}$. Dieses ΔCt wurde in die Gleichung $2^{-\Delta Ct}$ eingesetzt. Über das Ergebnis, eine einheitslose Zahl, konnten die relativen Expressionslevel der MHC I- und MHC II-Gene in den verschiedenen Proben miteinander verglichen werden.

Zuerst wurde das für die Anzahl der cDNA-Proben benötigte Volumen der einzelnen Komponenten auf der Grundlage einer Reaktion berechnet und der Mix angesetzt: 12,5 μl Mastermix, 10,5 μl H₂O und 1 μl des TaqMan® Gene Expression Assays für HPRT, MHC I bzw. MHC II (enthält jeweils das Primerpaar und die Sonde). Die cDNA-Proben wurden zum Mischen mittels Vortexgerät geschüttelt und kurz zentrifugiert. Eine cDNA-Probe wurde mit jeweils 1,5 μl auf 6 PCR-Röhrchen zum Zwecke der Doppelwertbestimmung aufgeteilt und der HPRT-, MHC I- und MHC II-

Mix in jeweils 2 PCR-Röhrchen dazugegeben. Pro Platte liefen eine HPRT-, MHC I- und MHC II-Probe ohne cDNA à jeweils 1 µl zur Leerwertbestimmung mit. Die Proben wurden verschlossen, zentrifugiert und der PCR-Cycler mit Ihnen beladen. Die Real-time-quantitative-PCR umfasste 40 Zyklen mit den folgenden Stufen:

- I. 2 min bei 50°C
- II. 10 min bei 95°C
- III. 40 Zyklen:
 - 15 s bei 95°C
 - 1 min bei 60°C
- IV. 4°C

3.7 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert oder Median und *Standard Error of Mean* (SEM) oder Standardabweichung angegeben. Für die statistische Auswertung wurden der one-way ANOVA und der Kruskal-Wallis-Test bei Vergleich von mehr als 2 Gruppen, der Zweistichproben-t-Test, der Wilcoxon-Test und der Mann-Whitney-U-Test bei Vergleich zweier Gruppen und der two-way ANOVA bei Einfluss von 2 Variablen mit Hilfe des statistischen Auswertungsprogramms GraphPad Prism Version 6.0 verwendet. Die grafische Darstellung der Daten erfolgte ebenfalls mit diesem Programm. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

Die *in vitro* Markierung von Hepatozyten mit MPIOs vor Leberzelltransplantation stellt aktuell eine der geeignetsten Methoden zur *in vivo* Detektion der selbigen in der MRT dar. Über die immunogenen Eigenschaften und Wirkungen der Eisenpartikel bzw. Eisenmarkierung ist jedoch kaum etwas bekannt. Erste Einblicke, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation diesbezüglich gewonnen wurden, werden auf den folgenden Seiten aufgezeigt. Zuerst werden die Ergebnisse bezüglich Zellzahl, -viabilität und -partikelbeladung dargestellt. Anschließend werden die Veränderungen der Lymphozytensubpopulationsanteile bezogen auf die Applikationsroute sowie den Zeitpunkt vor bzw. nach Transplantation im Vergleich zur Transplantation nativer Hepatozyten aufgeführt. Weiterhin erfolgt ein Vergleich zwischen MPIO-markierten Hepatozyten und den Kontrollgruppen bei Transplantation über die Arteria gastroepiploica. Der zweite Teil beschäftigt sich mit den Ergebnissen der Zytokin-induzierten MHC I- und MHC II-Expression auf porcinen Hepatozyten. Abschließend werden laborchemische Parameter der Tiere und Komplikationen aufgezeigt.

4.1 Zellzahl und -viabilität vor Leberzelltransplantation

Die Quantifizierung und Viabilitätsbestimmung der porcinen Hepatozyten erfolgte mittels Trypanblau unter dem Lichtmikroskop. Nach Leberzellisolierung lag die durchschnittliche Zellzahl bei $2,8 \times 10^9$. Die durchschnittliche Viabilität belief sich auf 75%. Nach 18-stündiger Kultivierung, 4-stündiger Inkubation mit MPIOs und Trypsinierung der Hepatozyten betrug die durchschnittliche Viabilität nun $43,7 \pm 1,4\%$. Die Partikelbeladung pro Zelle lag durchschnittlich bei 20 ± 1 , die Markierungseffizienz bei $94,6 \pm 0,8\%$. In der Versuchsgruppe der intraarteriellen Applikation von MPIO-markierten Hepatozyten erhielt jedes Tier durchschnittlich $6,5 \times 10^7$ Zellen (SEM: 10,04). In der Milzparenchymgruppe wurden durchschnittlich $7,7 \times 10^7$ (SEM: 10) Leberzellen transplantiert und über die Pfortader wurden durchschnittlich $7,3 \times 10^7$ (SEM: 10,35) Zellen pro Schwein appliziert. In der Kontrollgruppe der nativen Hepatozyten lag die Viabilität nach Kultivierung und Adhäsionslösung bei $33 \pm 9\%$ und im Mittel wurden 5×10^7 Zellen transplantiert (SEM: 5,85). Die Zellzahl war in der Gruppe der MPIO-markierten und in der Gruppe der nativen Hepatozyten nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,0795$).

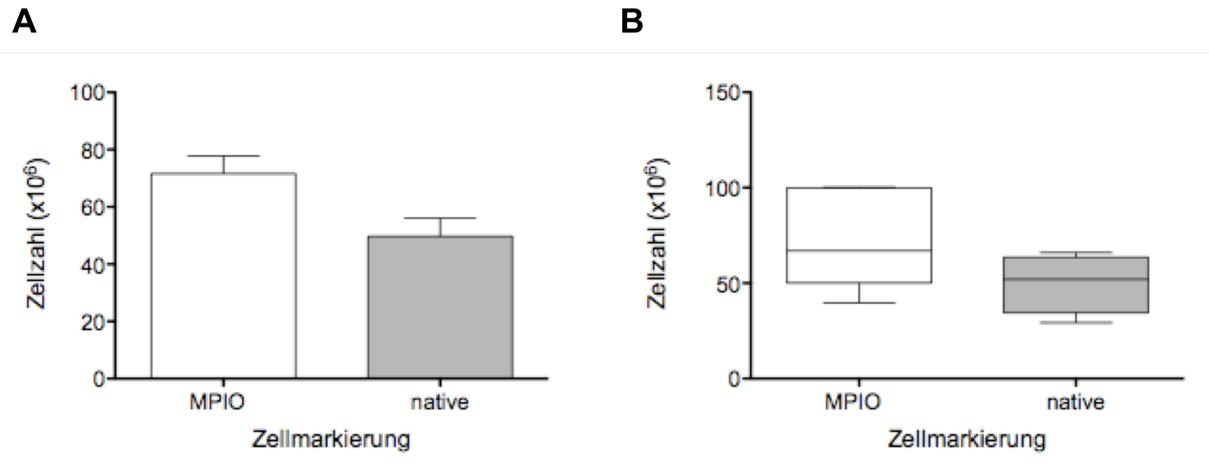


Abbildung 4: Durchschnittlich transplantierte Zellzahl bei Transplantation von MPIO-markierten Hepatozyten (MPIO) und nativen Hepatozyten (native). Dargestellt sind A) Mittelwert und SEM sowie B) Tukey mit Median und Einzelwert-Verteilung aus n = 15 bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 6 bei Transplantation nativer Hepatozyten.

4.2 Immunologischer Status nach Transplantation MPIO-markierter Leberzellen

Zur Evaluation des immunologischen Status nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der PBMCs der jeweiligen Tiere 8 Tage vor Transplantation, am Tag 0 vor Transplantation bei bereits immunsupprimierten Tieren sowie an den postoperativen Tagen 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert und alle weiteren Ergebnisse der anderen Tage in Bezug auf diesen Ausgangswert gesetzt bzw. umgerechnet. Wenn nicht anders erwähnt, beziehen sich die nachfolgenden beschriebenen prozentualen Veränderungen der einzelnen analysierten Lymphozytensubpopulationen auf den Ausgangswert (Tag -8), der auf 100% normiert wurde. Die weiblichen Empfängerschweine der LCT mit MPIOs bildeten entsprechend der zu untersuchenden Applikationsrouten A. gastroepiploica, intrasplenische Injektion und V. portae 3 Experimentalgruppen jeweils à 3-5 Tieren. Als Kontrolle diente zum einen die Transplantation nativer Hepatozyten. Auch hier wurden die Empfängertiere in 3 Gruppen entsprechend der unterschiedlichen Applikationsrouten mit jeweils 2 Tieren unterteilt. Eine statistische Erhebung gelang in dieser Gruppe auf Grund der zu geringen Versuchszahl von n = 2 nicht. Die Transplantation isolierter MPIO-Partikel via A. gastroepiploica in 4 Tieren diente als weitere Kontrollgruppe. Hier wurden die Untersuchungen postoperativ nur bis Tag 7 durchgeführt.

Die immunologische Statuserhebung mittels FACS-Analyse wurde mit den Antikörpern anti-CD3 ϵ -AK, anti-CD4-AK, anti-CD25-AK und anti-MHCII-AK durchgeführt.

Analysiert wurden die Zellpopulationen CD3+ T-Zellen, CD3+CD4+ T-Zellen und CD3+CD8+ T-Zellen (Abb. 5B), CD3+CD4+MHCII+CD25- aktivierte T-Zellen (Abb. 6A), CD3+CD8+MHCII+CD25- aktivierte T-Zellen (Abb. 6B) und CD3-MHCII+ mononukleäre Zellen (Abb. 7).

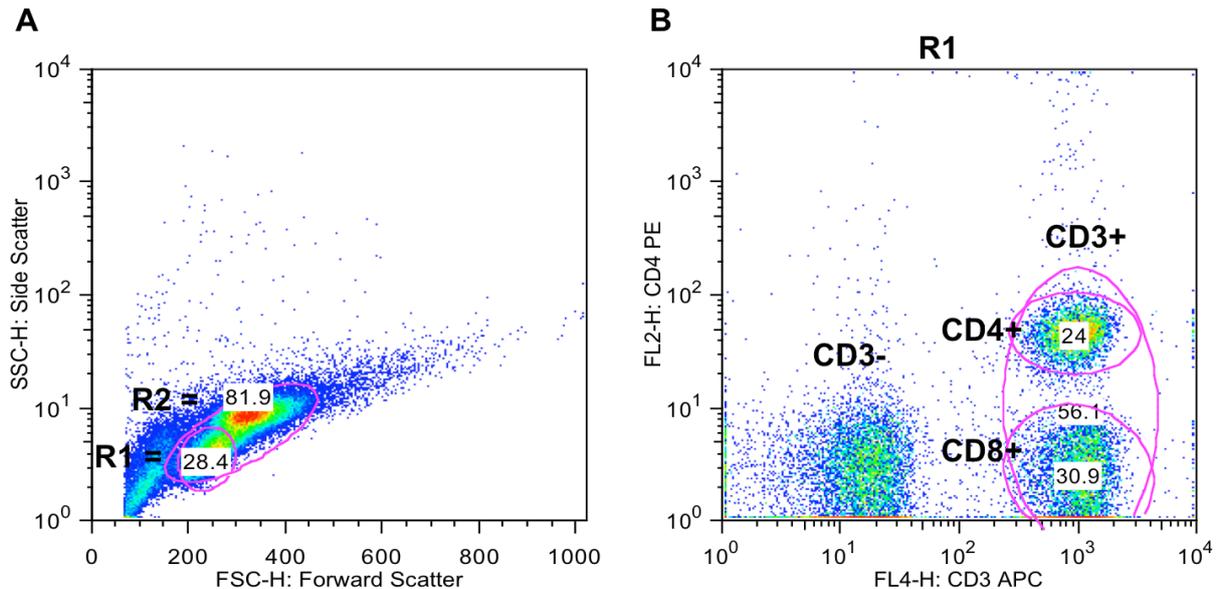


Abbildung 5: Gating der PBMCs im FACS. Als exemplarisches Beispiel dient der 2. postoperative Tag von einem Tier, das MPIO-markierte Hepatozyten über die A. gastroepiploica erhalten hat. A) Lymphozyten- (R1) und Lymphozyten-Monozyten-Gate (R2) im Forward und Side Scatter. B) Im R1-Gate sind unter Verwendung des antiCD3 ϵ -AKs und anti-CD4AKs die CD3- und CD3+ Subpopulation sowie in der CD3+ Subpopulation die CD4+ und CD8+ Subpopulation dargestellt.

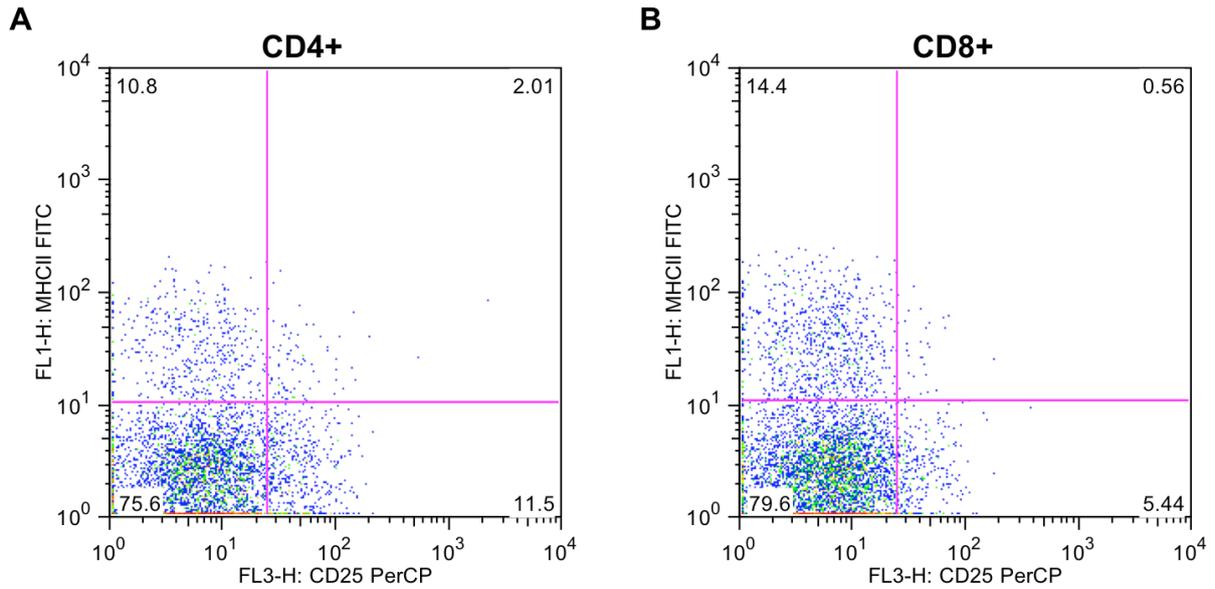


Abbildung 6: Gating der PBMCs im FACS. Dargestellt ist dasselbe Tier wie in Abb. 4. In der A) CD4+ Subpopulation und B) CD8+ Subpopulation werden unter Verwendung des anti-MHCII-AKs und des anti-CD25-AKs die Verteilung der MHCII+/- CD25+/- Zellen gezeigt.

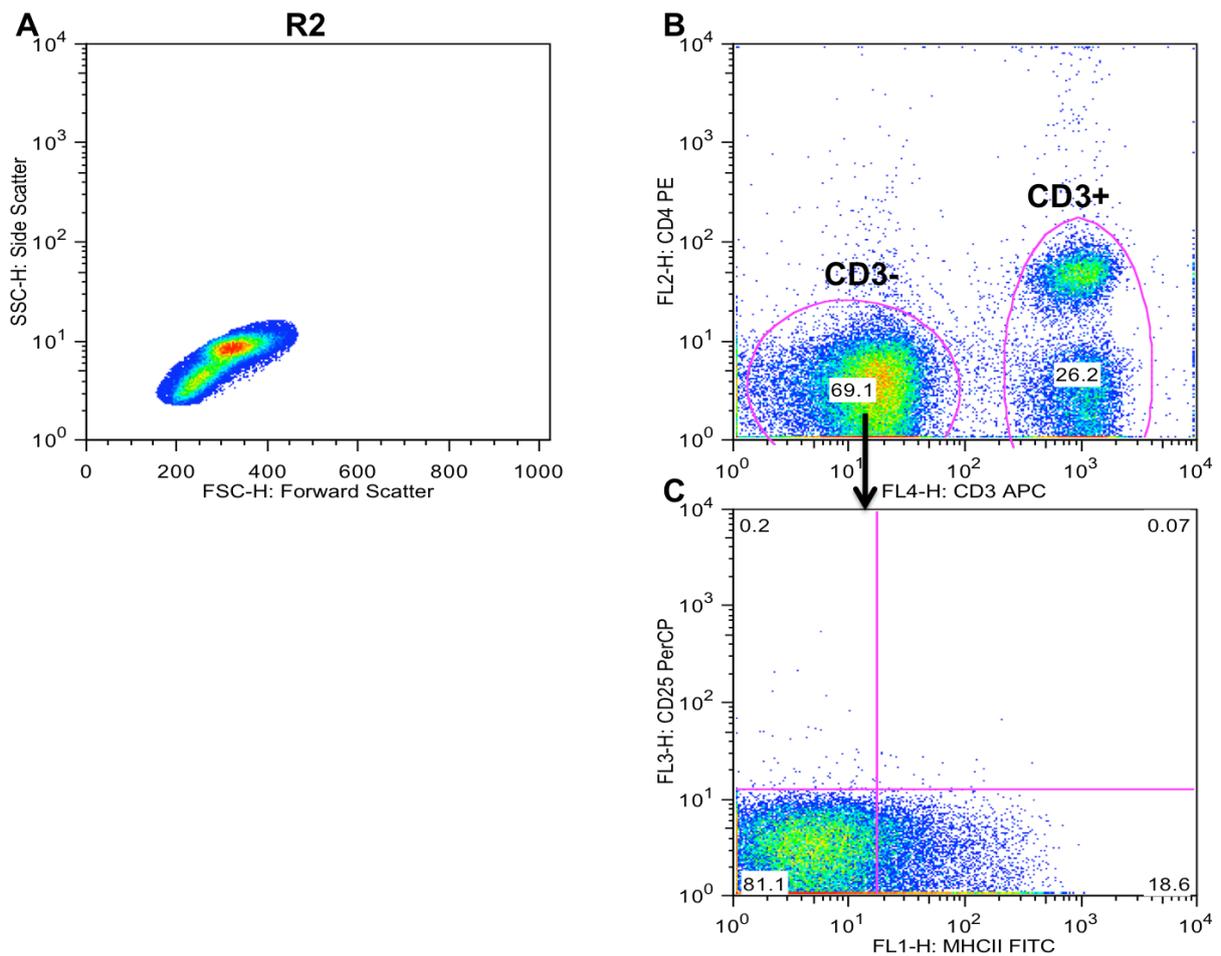


Abbildung 7: Gating der PBMCs im FACS. Dargestellt ist dasselbe Tier wie in Abb. 4. Im A) R2-Gate (Lymphozyten+Monozyten) wird B) die Verteilung der CD3- und CD3+ Subpopulationen dargestellt. In der C) CD3- Subpopulation wird unter Verwendung des anti-MHCII-AKs die Verteilung der MHC II- und MHC II+ Zellen gezeigt.

4.2.1 Vergleich immunologischer Reaktionen zwischen MPIO-markierter und nativer Leberzelltransplantation

4.2.1.1 Veränderungen im Anteil der CD3+ T-Zellen

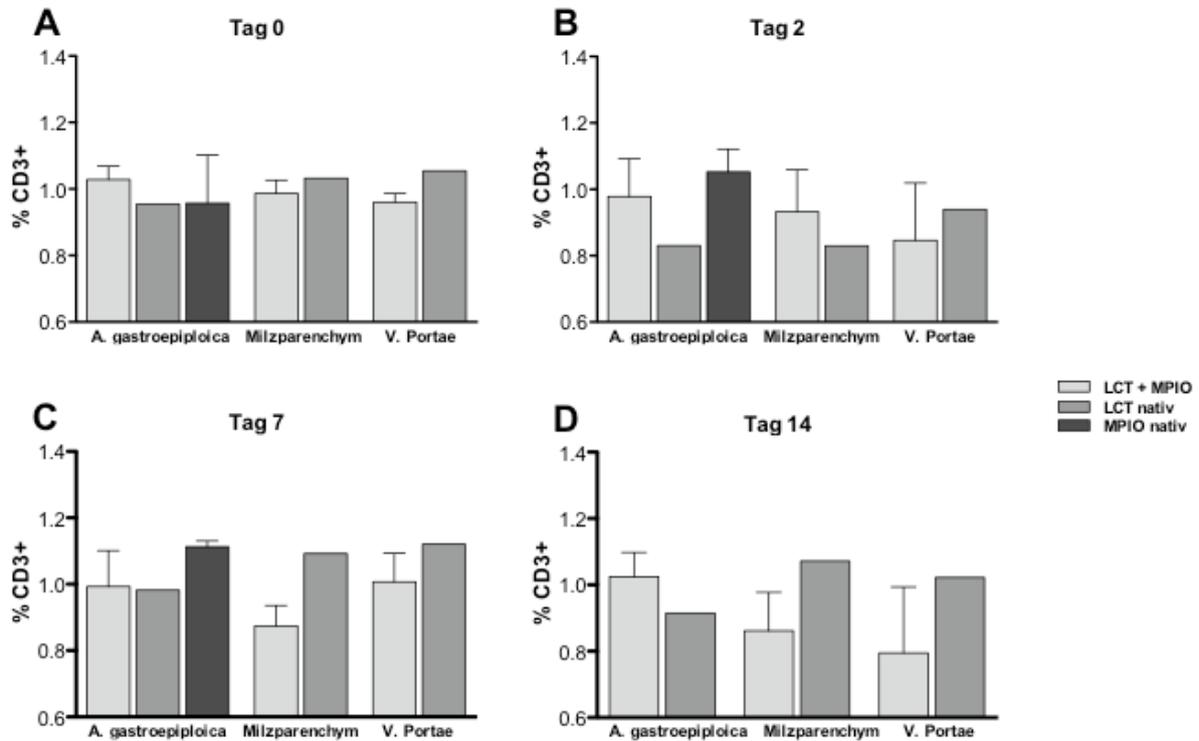


Abbildung 8: Prozentuales Verhalten der CD3+ Zellen im Lymphozyten-Gate nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD3+ Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, n = 2 pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica.

Die Immunsuppression, welche 2 Tage vor Transplantation begonnen wurde, bewirkt sowohl in der MPIO-markierten als auch der nativen Hepatozytengruppe am Tag 0 teilweise eine Normierung des Anteils der CD3+ T-Zellen. Nach Transplantation kommt es in allen Gruppen im Vergleich zum präoperativen Tag -8 am Tag 2 zum Abfall des Anteils an CD3+ T-Zellen, in der eisenmarkierten Gruppe am deutlichsten nach Applikation über die Pfortader (-15%), in der nativen Hepatozytengruppe am deutlichsten nach intrasplenischer Injektion (-17%), beides jeweils nicht signifikant. In der eisenmarkierten Gruppe lässt sich ein nicht signifikanter Abfall der T-Zellen nach intrasplenischer Applikation (-14%) und solcher via V. portae (-20%) am Tag 14 erkennen, wohingegen das Niveau in der Milzarteriengruppe etwa gleichbleibend ist. Demgegenüber entwickelt sich in der nativen Hepatozytenvergleichsgruppe nach 2

Wochen eine leicht abnehmende Tendenz in der Arteria-gastroepiploica-Gruppe (-8%). Dagegen ist eine leichte Zunahme des CD3+ Zellanteils bei den Schweinen nach intrasplenischer Injektion ersichtlich (+7%). Die Pfortaderapplikation zeigt im Vergleich zum Ausgangsniveau annähernd gleiche Werte.

4.2.1.2 Veränderungen im Anteil der CD3+ CD4+ T-Zellen

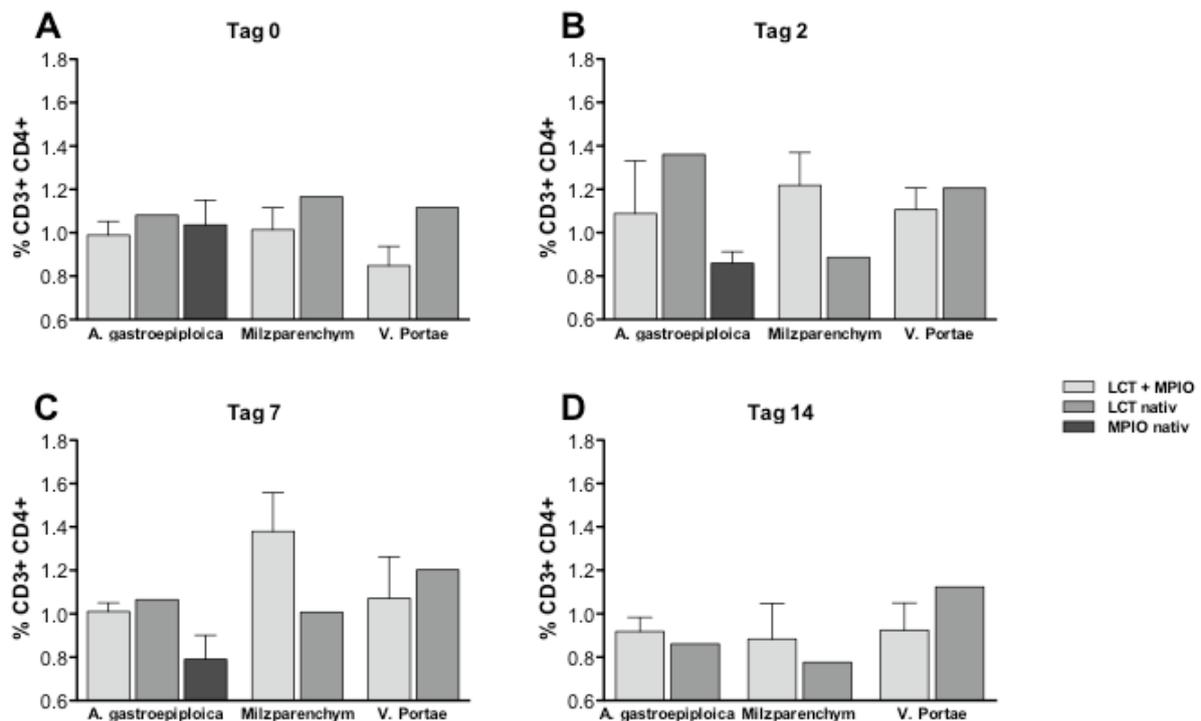


Abbildung 9: Prozentuales Verhalten der anteiligen CD4+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD3+CD4+ Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, n = 2 pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs via A. gastroepiploica.

Die CD4+CD3+ T-Zellen sind in der Gruppe, der MPIO-markierte Hepatozyten transplantiert wurden, in den jeweiligen Applikationsgruppen nicht auf gleichem Ausgangsniveau und am Tag 0 ist keine Angleichung durch die am Tag -2 begonnene Immunsuppression zu erkennen.

In der MPIO-markierten Hepatozytengruppe steigt am Tag 2 nach Transplantation der Anteil der CD3+CD4+ T-Zellen in allen 3 Applikationsgruppen an, am deutlichsten nach intrasplenischer Transplantation (+22%) und nach Transplantation über die Pfortader (+11%, gegenüber Tag 0 +26%), jedoch ohne Signifikanz.

Während der CD4+ Anteil nach Applikation über die A. gastroepiploica und Pfortader am Tag 7 wieder leicht abnimmt, erreichen die Werte nach intrasplenischer Injektion an diesem Tag mit +38% ihr Maximum. Der nachfolgende Abfall von Tag 7 auf Tag 14 ist in dieser Applikationsgruppe signifikant (siehe Abbildung 16, $p < 0,05$). Am Tag 14 fallen die Werte in allen drei Applikationsgruppen jeweils bis unter ihr Ausgangsniveau.

In der nativen Leberzellgruppe findet sich ein transplantationsassoziiertes Abfall des CD4+ Zellanteils am Tag 2 beim intrasplenischen Transplantationsweg (-11%), wohingegen der Anteil in den beiden anderen Gruppen ansteigt. Hier ist der größte Sprung in der A.-gastroepiploica-Gruppe zu verzeichnen (+36%). Am Tag 14 zeigt sich in der intraarteriellen (-14%) und Milzparenchymgruppe (-22%) eine absteigende Tendenz, in der Pfortadergruppe mit +12% eine zunehmende.

4.2.1.3 Veränderungen im Anteil der CD3+ CD8+ Zellen

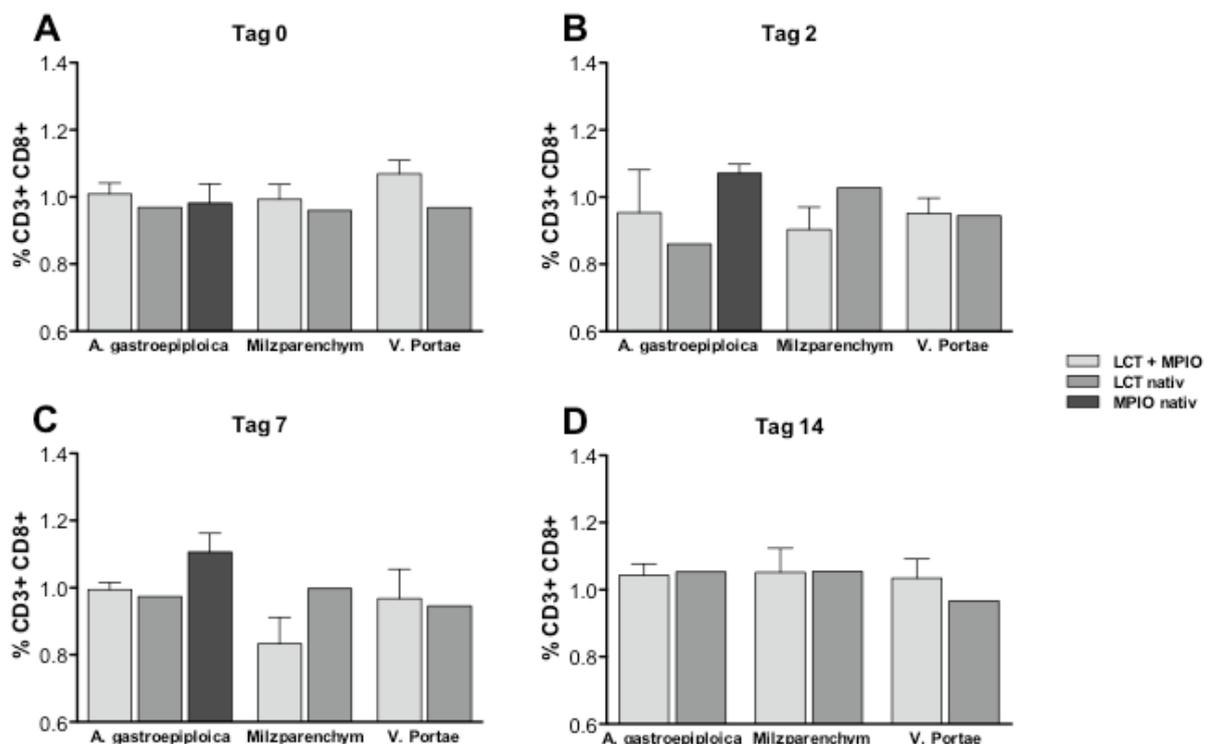


Abbildung 10: Prozentuales Verhalten der anteiligen CD8+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD3+CD8+ Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus $n = 3-5$ pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, $n = 2$ pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und $n = 4$ bei Injektion von isolierten MPIOs via A. gastroepiploica.

Der Anteil der CD8+ T-Zellen an den CD3+ T-Zellen ist am Tag 0 in den Applikationsgruppen der MPIO-markierten und nativen Hepatozytentransplantationen gering voneinander abweichend. Eine Ausnahme bildet hier die Applikation von MPIO-markierten Hepatozyten via V. portae mit einer Anteilszunahme um 7%. Am Tag 2 zeigt sich bis auf die Milzparenchymroute der nativen Hepatozyten (+3%) ein gleichermaßen transplantationsassoziiertes Abfall des CD8+ Anteils – am deutlichsten, aber nicht signifikant, nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten via Milzparenchym (-10%) und nach Applikation nativer Hepatozyten über die A. gastroepiploica (-14%). Anschließend steigen die Werte bis auf die Applikation MPIO-markierter Hepatozyten via Milzparenchym wieder an. Nachdem der Anteil hier am Tag 7 weiter absinkt (-17%), ist der nachfolgende Wiederanstieg (+5%, gegenüber Tag 7 +22%) am Tag 14 signifikant (siehe Abbildung 17, $p < 0,05$). Auch die Applikation nativer Hepatozyten führt an diesem Tag zu einem diskreten Abfall des CD8+ Zellanteils. Bis auf die Gruppe der nativen über die Pfortader applizierten Hepatozyten übertreffen die Werte der anderen Gruppen leicht ihr Ausgangsniveau. Es zeigen sich aber keine statistisch signifikanten Änderungen. Darüber hinaus wird insgesamt eine CD4+/CD8+ Ratio zu Gunsten von CD8+ im Verhältnis ca. 1:3 deutlich (nicht-normierte Werte, keine Abbildung).

4.2.1.4 Veränderungen im Anteil der CD4+ Effektor-T-Zellen

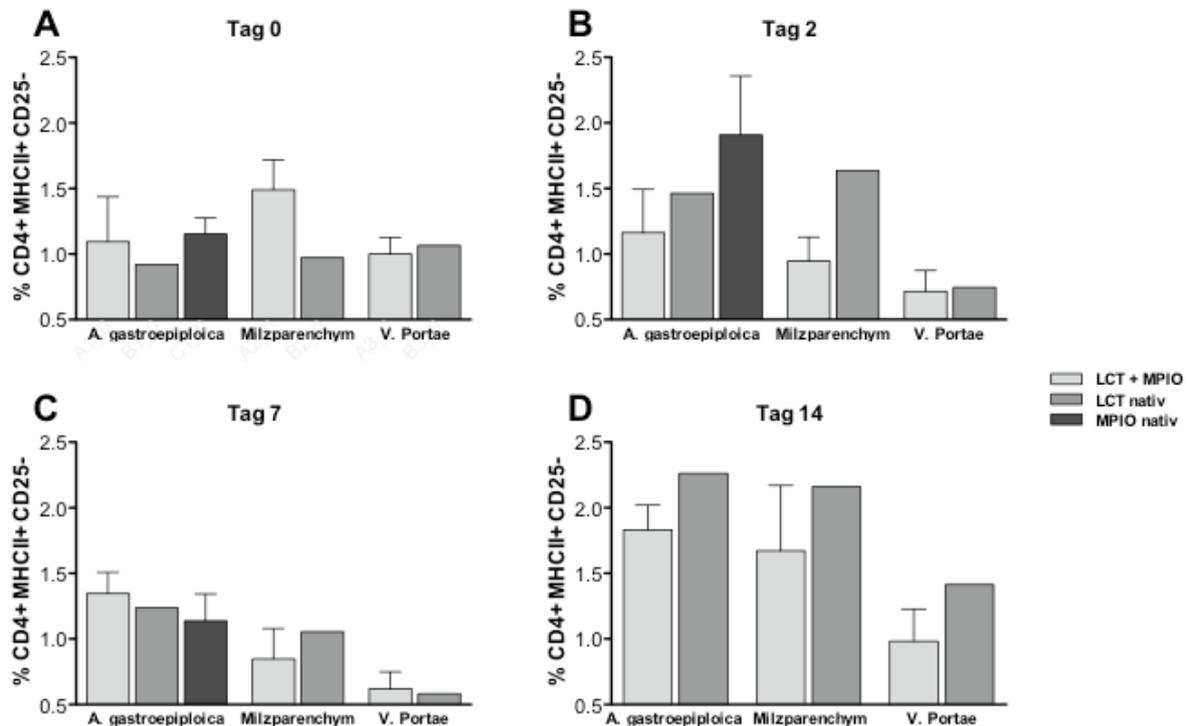


Abbildung 11: Prozentuales Verhalten der anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD4+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD4+MHCII+CD25- Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, n = 2 pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica.

Der Anteil der CD4+ T-Effektorzellen (MHCII+CD25- T-Zellen) befindet sich sowohl in der MPIO-markierten als auch in der nativen Leberzellgruppe am Tag 0 nicht auf gleichem Ausgangsniveau.

In der MPIO-markierten Hepatozytengruppe steigen am Tag 2 die Werte nach intraarterieller Applikation an (+16,3%, gegenüber Tag 0 +6,9%), während sie nach Milzparenchym- mit -5,4% und nach portaler Injektion mit -28,4% abfallen, jeweils ohne Signifikanz.

In der Gruppe der nativen Hepatozytentransplantation zeigt sich am Tag 2 bis auf den Pfortaderweg (-25,5%) eine Zunahme des CD4+Effektor-T-Zell-Anteils: +46,2% nach intraarterieller Applikation und +63,6% nach Milzparenchyminjektion. Am Tag 7 kommt es bis auf die Gruppe, der MPIO-markierte Hepatozyten über die A.

gastroepiploica transplantiert wurden (+18,3% gegenüber Tag 2), zu einem Abfall des T-Zell-Effektoranteils.

Auffällig ist ein später Anstieg nach 2 Wochen in der eisenmarkierten und noch ausgeprägter in der nativen Hepatozytengruppe bei allen 3 Applikationsrouten über das jeweilige Ausgangsniveau hinaus, jeweils ohne Signifikanz. Eine Ausnahme bildet hier die Applikation von MPIO-markierten Hepatozyten über die Pfortader, da der Anteil am Tag 14 um 1,8% sinkt. Bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten macht dabei der Anteil der CD4+ T-Effektorzellen nach Applikation über das Milzparenchym von Tag 7 auf Tag 14 mit +82,5% ($p > 0,05$) den größten Sprung. Ebenso ist dies bei Transplantation nativer Hepatozyten via Milzparenchym der Fall (+110% gegenüber Tag 7).

4.2.1.5 Veränderungen im Anteil der CD8+ Effektor-T-Zellen

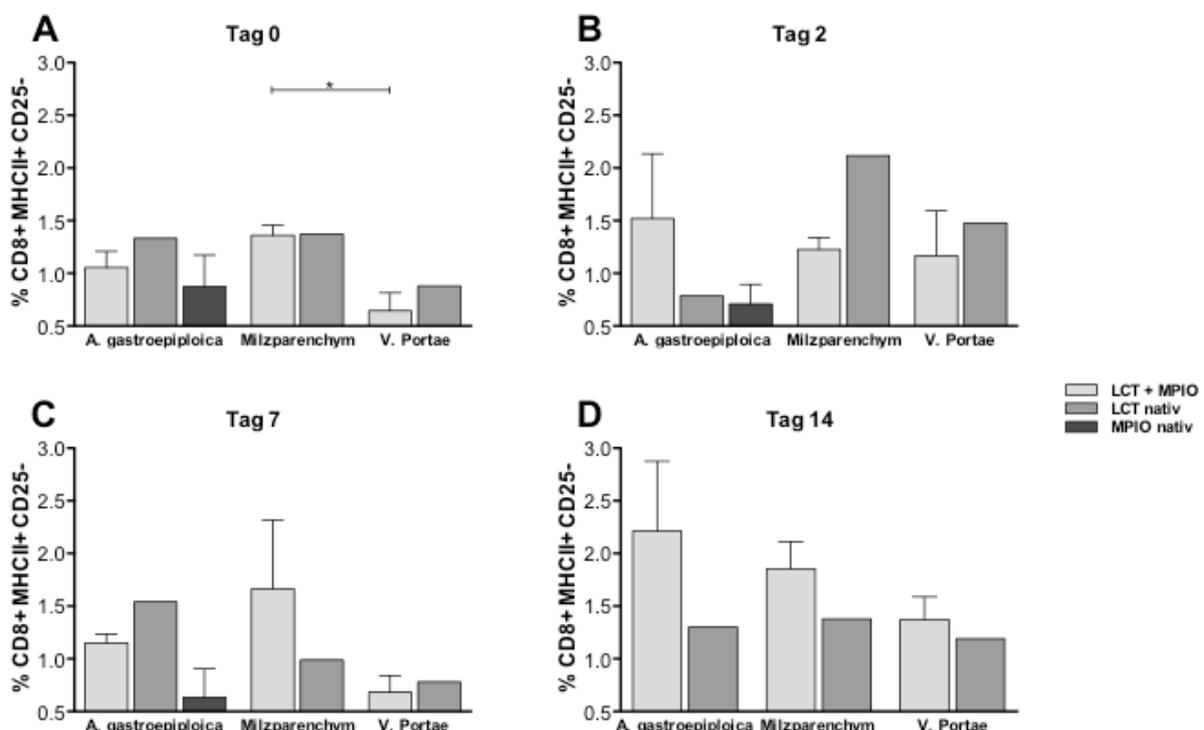


Abbildung 12: Prozentuales Verhalten der anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD8+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD8+MHCII+CD25- Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus $n = 3-5$ pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, $n = 2$ pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und $n = 4$ bei Injektion von isolierten MPIOs via A. gastroepiploica. Der Anteil in den Gruppen LCT+MPIO via Milzparenchym und V. portae ist am Tag 0 signifikant unterschiedlich, $p < 0,05$.

Die CD8+MHCII+CD25- T-Effektorzellen starten in den beiden Gruppen der markierten und nicht-markierten Hepatozyten von unterschiedlichen Ausgangsniveaus. Am präoperativen Tag 0 ist der CD8+ T-Effektor-Anteil zwischen den Applikationsgruppen, die MPIO-markierte Hepatozyten über das Milzparenchym und die Pfortader erhalten haben, signifikant unterschiedlich ($p = 0,0355$).

Bei den Tieren, die eisenmarkierte Hepatozyten erhielten, wird ein Anstieg von Tag 0 auf Tag 2 und Tag 7 auf Tag 14 postoperativ deutlich. Nach intraarterieller Applikation steigt der Anteil von Tag 0 auf Tag 2 um 46%, um nach Abfall auf Tag 7 (-37%) von Tag 7 auf Tag 14 wieder anzusteigen (+106%). Der Anstieg von Tag -8 auf Tag 14 ist hierbei signifikant (siehe Abbildung 19, $p < 0,05$). Ein ähnliches Verhalten zeigt sich nach Pfortaderapplikation. Direkt nach Transplantation steigen die Werte von Tag 0 auf Tag 2 um 52% an, gefolgt von einem Abfall an Tag 7 um 49%, um am Tag 14 wieder um 70% zuzunehmen. Hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede hervorheben. Nach Milzparenchyminjektion fällt hingegen direkt nach Transplantation ein leichter Abfall des Anteils der CD8+ T-Effektorzellen auf (-13% gegenüber Tag 0). Danach zeigt sich ein nicht signifikanter kontinuierlicher Anstieg.

Demgegenüber wird nach Transplantation nativer Hepatozyten über das Milzparenchym und die Pfortader ein ebenso biphasischer Verlauf mit Anstiegen an Tag 2 und 14 postoperativ deutlich. Insbesondere die Zunahmen von Tag 7 auf Tag 14 fallen geringer aus als jene bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten: Nach Milzparenchyminjektion steigt der Anteil von Tag 7 auf Tag 14 um 39%, nach Pfortaderapplikation um 41%. Auf der anderen Seite kommt es nach Milzarterienapplikation direkt nach Transplantation am Tag 2 zunächst zu einem Abfall (-54% gegenüber Tag 0) sowie ebenso am Tag 14 (-24% gegenüber Tag 7). Ein Anstieg um 75% ist von Tag 2 auf Tag 7 zu verzeichnen.

4.2.1.6 Veränderungen im Anteil der CD3- MHC II+ Nicht-T-Zellen

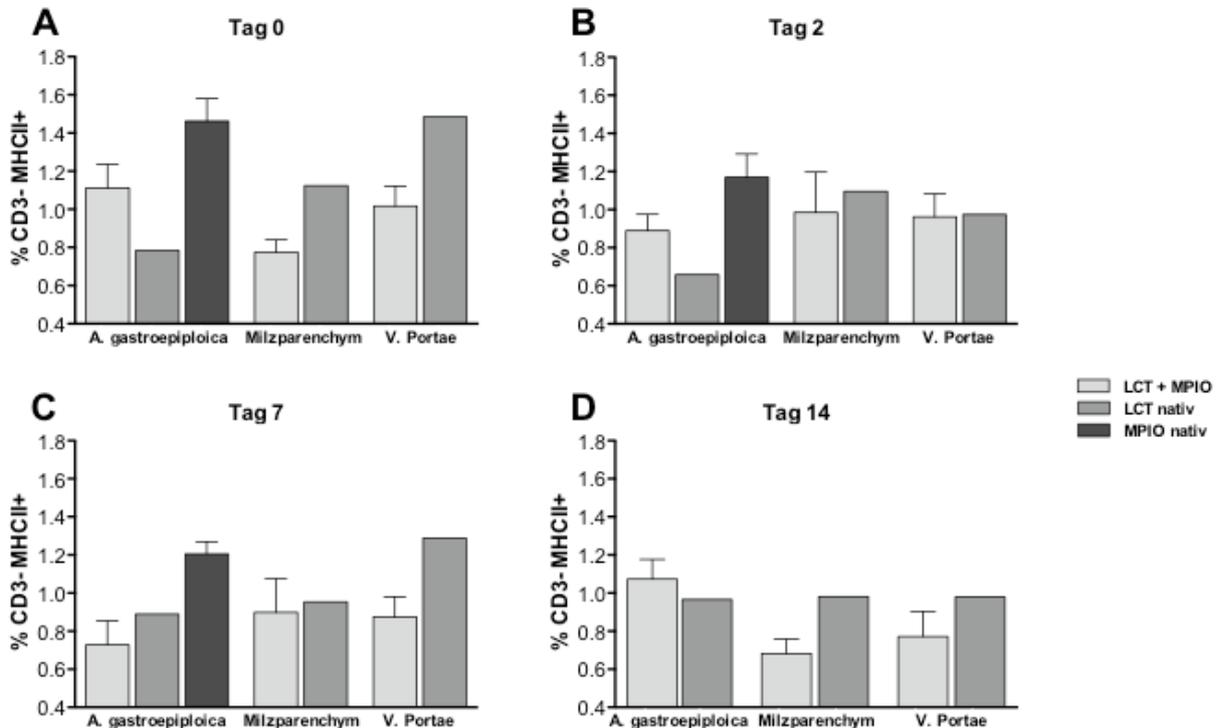


Abbildung 13: Prozentuales Verhalten der anteiligen MHCII+ Zellen an den CD3- Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD3-MHCII+ Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, n = 2 pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica.

Die Ausgangswerte bezüglich des Anteils der MHC II+ Zellen an den CD3- Nicht-T-Zellen sind in der MPIO-markierten Gruppe und in der nativen Gruppe am Tag 0 nicht auf gleichem Niveau.

In der eisenmarkierten Gruppe fällt der Anteil nach Applikation via A. gastroepiploica von Tag 0 auf Tag 2 um 22%, ebenso von Tag 2 auf Tag 7 um 16%. Zuletzt steigen die Werte von Tag 7 auf Tag 14 nicht signifikant an (+34%). Nach Pfortaderapplikation zeigt sich postoperativ ein kontinuierlicher Abfall ohne Signifikanz. Nachdem der Anteil der MHC II+ Zellen an den CD3- Zellen nach Milzparenchyminjektion zunächst nach Transplantation zunimmt (+21%), stellt sich anschließend ebenso ein kontinuierlicher Abfall ein (ohne Signifikanz). Insgesamt liegen die Werte nach Milzparenchym- (-32%) und Pfortaderapplikation (-23%) am Tag 14 deutlich unter ihrem Ausgangsniveau.

In der nativen Hepatozytengruppe lässt sich am Tag 2 bei allen Applikationsrouten eine Abnahme des MHCII+ Anteils beobachten, am deutlichsten nach Pfortaderinjektion (-50% gegenüber Tag 0). Im weiteren Verlauf sinkt der Anteil nach Milzparenchymapplikation kontinuierlich, während er nach Gabe via A. gastroepiploica kontinuierlich steigt. Die Pfortaderroute bewirkt von Tag 2 auf Tag 7 eine Zunahme (+31%); zuletzt nimmt der Anteil von Tag 7 auf Tag 14 ab (-31%). Insgesamt landen die Werte aller 3 Applikationsrouten am Tag 14 unterhalb ihres Ausgangsniveaus.

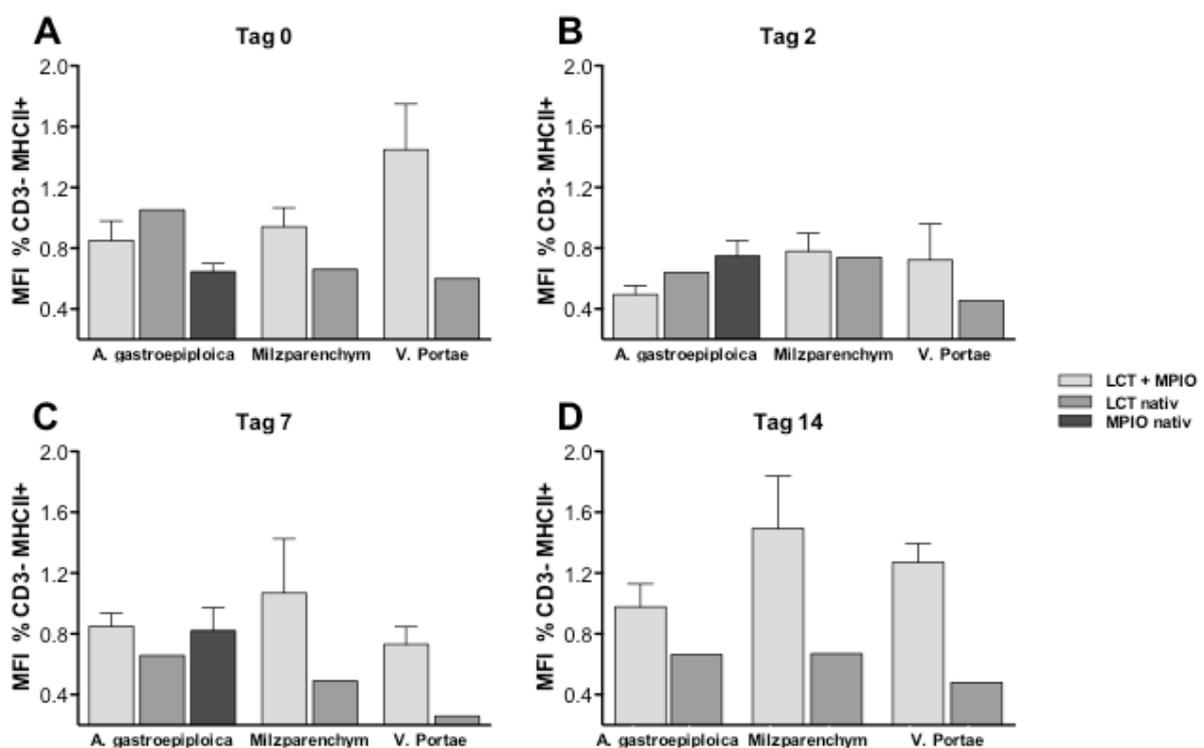


Abbildung 14: Mean Fluorescence Intensity (MFI) der MHCII+ Zellen in den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter (LCT+MPIO) und nativer Hepatozyten (LCT nativ) über die 3 Applikationswege A. gastroepiploica, Milzparenchym und V. portae am A) präoperativen Tag 0 sowie an den postoperativen Tagen B) 2, C) 7 und D) 14. Zusätzlich werden die %CD3-MHCII+ Werte bei Transplantation von isolierten MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica gezeigt. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, n = 2 pro Applikationsweg bei Transplantation nativer Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica.

Die Ausgangswerte der mittleren Fluoreszenzintensität der CD3-MHCII+ Zellen weichen am Tag 0 in allen Gruppen deutlich voneinander ab. Postoperativ präsentiert sich am Tag 2 in der MPIO-markierten Gruppe eine Abnahme bei Transplantation über alle 3 Wege: via A. gastroepiploica um 51%, via Milzparenchym

um 22% und via Pfortader um 28% (-73% gegenüber Tag 0). Hierbei ist der Abfall gegenüber Tag 0 bei Pfortadertransplantation signifikant (siehe Abbildung 21, $p < 0,05$). Im weiteren Verlauf nimmt der Anteil wieder zu. Ebenso zeigt sich dies am Tag 14 bei der Milzparenchymroute, da es gegenüber Tag 7 zu einer Zunahme von 46% kommt. Der Anstieg von Tag 2 auf Tag 14 (+71%) ist signifikant (siehe Abbildung 21, $p < 0,05$). Gleichermaßen deutlich ist eine Zunahme im zeitlichen Verlauf via Pfortader zu verzeichnen (+54% Tag 14 gegenüber Tag 7). Die geringsten Veränderungen lassen sich bei intraarteriellem Zugangsweg erkennen: +13% Tag 14 gegenüber Tag 7).

Die Transplantation nativer Hepatozyten ruft am 2. postoperativen Tag eine Abnahme der MFI nach intraarterieller Applikation (-36%) und nach Pfortaderapplikation hervor (-14% gegenüber Tag 0), während die Milzparenchyminjektion keine größeren Veränderungen bewirkt (+8% gegenüber Tag 0). Die Abnahme setzt sich an Tag 7 fort. Zuletzt stellt sich wieder eine Zunahme der MFI am Tag 14 ein, die jedoch deutlich geringer ausfällt als jene bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten: via A. gastroepiploica +1%, via Milzparenchym +18% und via Pfortader +22% (jeweils gegenüber Tag 7).

4.2.2 Vergleich immunologischer Reaktionen bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und freier Eisenpartikel

4.2.2.1 Veränderungen im Anteil der CD3+ T-Zellen

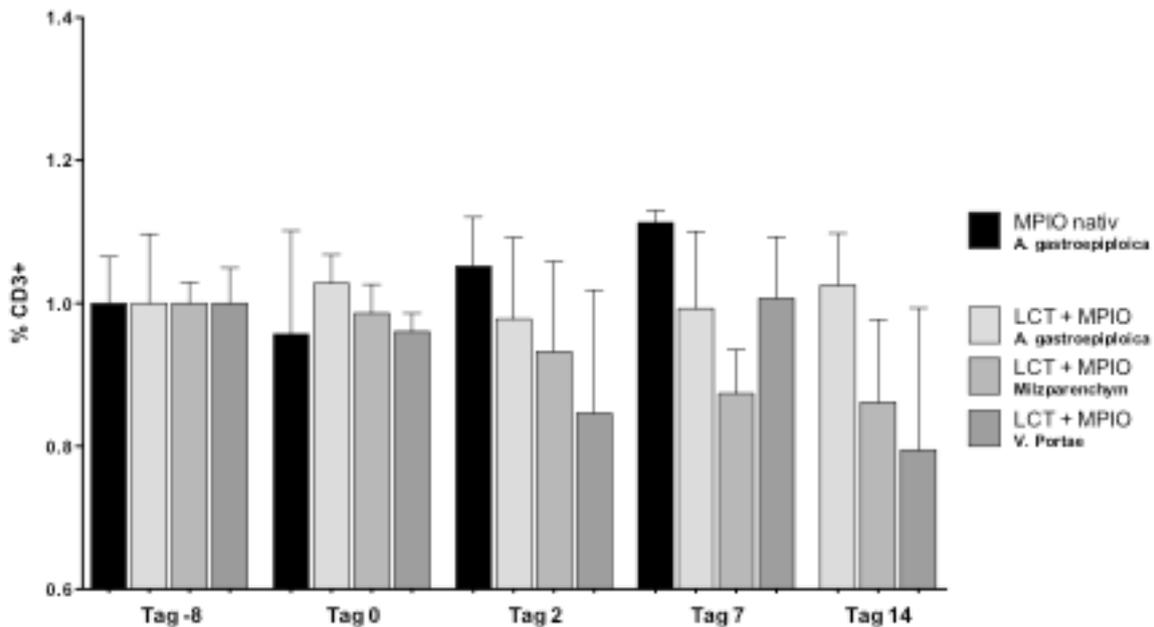


Abbildung 15: Prozentuales Verhalten der anteiligen CD3+ Zellen im Lymphozyten-Gate nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica.

Nach unterschiedlichen Ausgangsniveaus am Tag 0 in allen Experimentalgruppen kommt es bei der Applikation von MPIO-markierten Hepatozyten über alle 3 Applikationsrouten zu einem Abfall des CD3+ Zellanteils (-5% via A. gastroepiploica Tag 2 gegenüber Tag 0). Hingegen führt die Injektion von freien MPIO-Partikeln in die A. gastroepiploica zu einem Anstieg um 9% gegenüber Tag 0. Diese Tendenz setzt sich am Tag 7 fort, da gegenüber Tag 2 eine weitere Zunahme um 6% zu erkennen ist. Auch die Transplantation von MPIO-markierten Hepatozyten bewirkt einen Anstieg nach intraarterieller Applikation am Tag 7, der jedoch mit 1,5% gegenüber Tag 2 deutlich geringer ausfällt. Ebenso bewirkt die Pfortaderapplikation eine Zunahme des CD3+ Anteils, während die Milzparenchymroute zu einer Abnahme führt. Am Tag 14 steigt der Anteil nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica um weitere 3% gegenüber Tag 7. In den

anderen beiden Applikationsgruppen ist eine Abnahme zu verzeichnen. Signifikante Unterschiede traten jeweils nicht auf.

4.2.2.2 Veränderungen im Anteil der CD3+ CD4+ T-Zellen

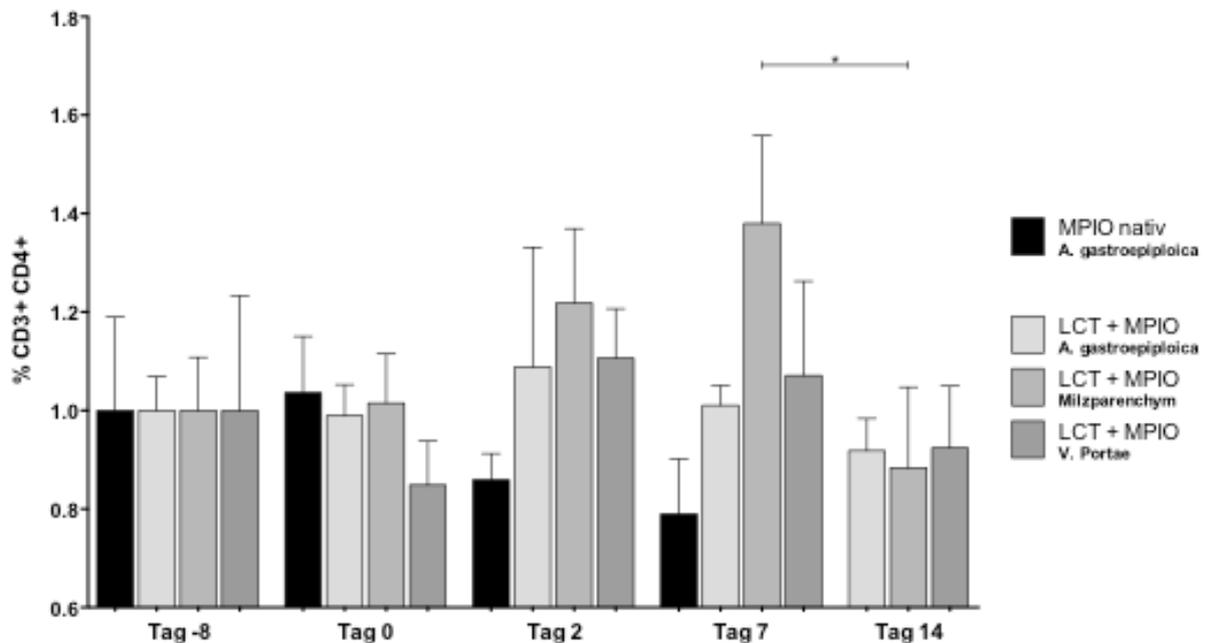


Abbildung 16: Prozentuales Verhalten der anteiligen CD4+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica. *p < 0,05.

Der Anteil der CD4+ T-Helferzellen an den CD3+ T-Zellen ist in allen Transplantationsgruppen am Tag 0 nicht auf gleichem Niveau. Auffallend ist, dass am 2. postoperativen Tag der Anteil in den MPIO-markierten Gruppen steigt (via A. gastroepiploica um 9%), während er bei Injektion freier MPIO-Partikel über die A. gastroepiploica deutlich, aber nicht signifikant, um 18% abnimmt. Diese Tendenz lässt sich auch am Tag 7 weiter verfolgen (-7% gegenüber Tag 2). Gleichermäßen sinkt auch der Anteil nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über diesen Weg am Tag 7 (-8% gegenüber Tag 2). Insbesondere bewirkt an diesem Tag die Milzparenchymroute eine Zunahme um 16% gegenüber Tag 7. Der darauffolgende Abfall auf Tag 14 um 50% gegenüber Tag 7 ist signifikant (p < 0,05). Auch die anderen beiden Applikationsrouten führen zu einer Abnahme (-9% via A. gastroepiploica Tag 14 gegenüber Tag 7).

4.2.2.3 Veränderungen im Anteil der CD3+ CD8+ T-Zellen

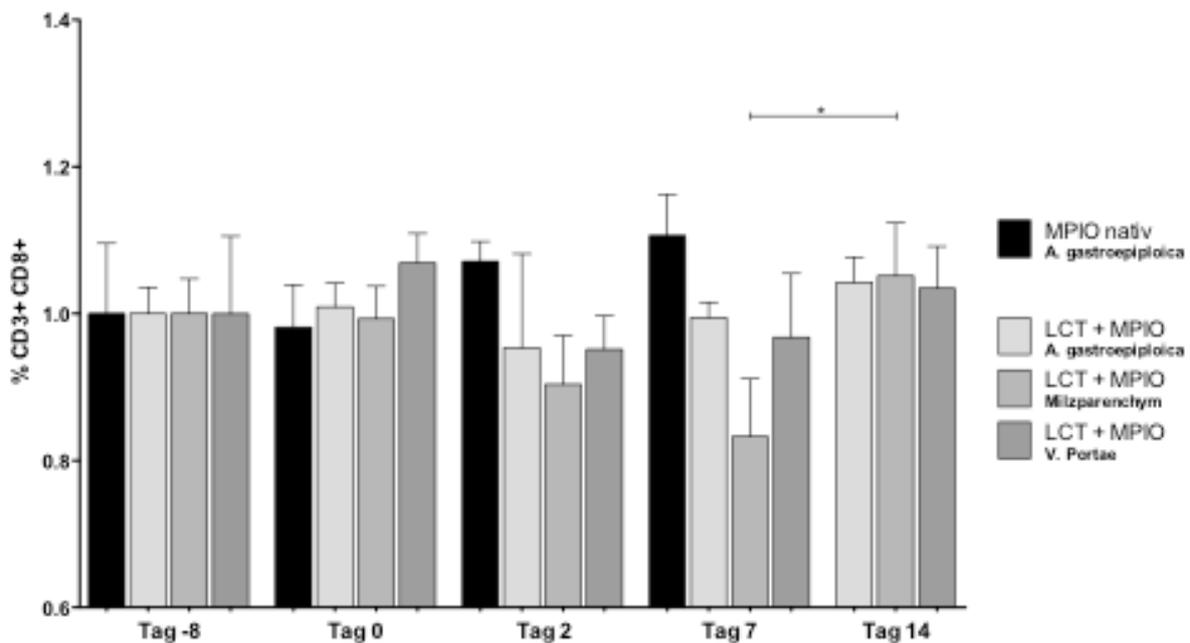


Abbildung 17: Prozentuales Verhalten der anteiligen CD8+ Zellen an den CD3+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica. *p < 0,05.

Die prozentualanteiligen CD8+ zytotoxischen T-Zellen an den CD3+ T-Zellen zeigen vor Transplantation am Tag 0 bis auf die Pfortaderroute ähnliche Ausgangsniveaus. Die Injektion isolierter MPIOs via A. gastroepiploica führt am Tag 2 zu einer Zunahme um 7%, wohingegen es in den MPIO-markierten Gruppen zu einer Abnahme kommt (via A. gastroepiploica -5%). Am Tag 7 steigt der Anteil bei intraarterieller Injektion freier MPIOs weiter um 4% gegenüber Tag 2 an. Auch die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über diese Route bewirkt eine Zunahme um 4% gegenüber Tag 2. Dieser Anstieg setzt sich am Tag 14 fort (+4% gegenüber Tag 7). Bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten in das Milzparenchym kommt es am Tag 7 zunächst zu einer weiteren Abnahme des CD8+ Anteils. Der nachfolgende Anstieg auf Tag 14 um 22% ist signifikant (p < 0,05). Die Pfortaderroute lässt einen kontinuierlichen Anstieg ab dem 2. postoperativen Tag erkennen.

4.2.2.4 Veränderungen im Anteil der CD4+ Effektor-T-Zellen

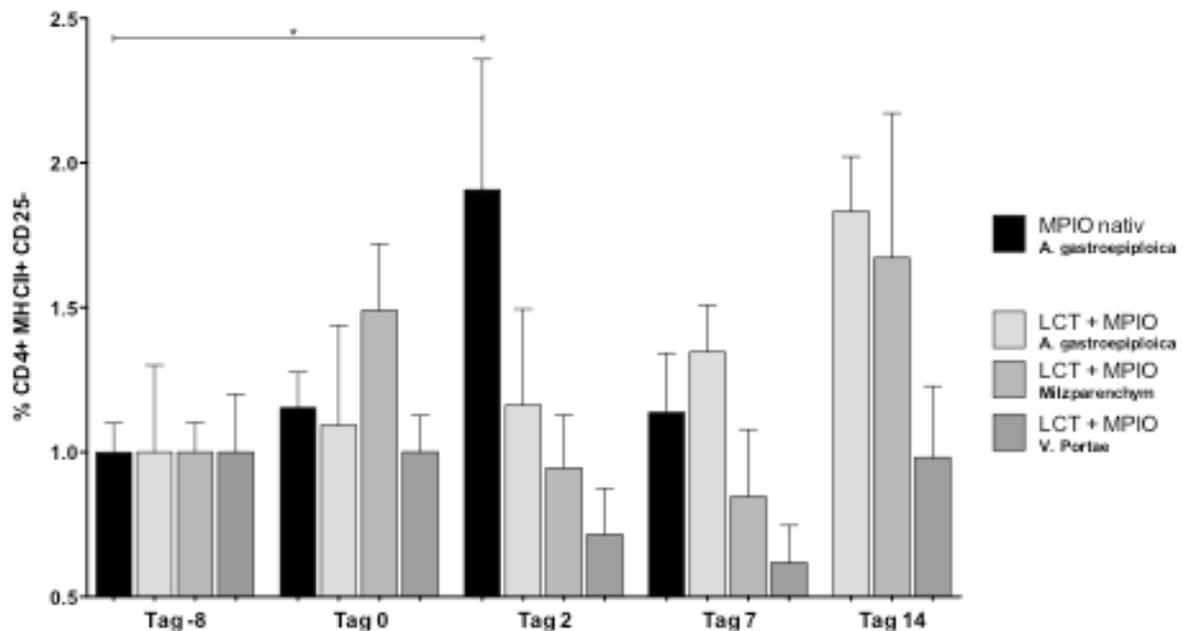


Abbildung 18: Prozentuales Verhalten der anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD4+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica. *p < 0,05.

Beim Anteil der CD4+ T-Effektorzellen (MHCII+CD25-) ist am Tag 0, nachdem zwei Tage zuvor die Verabreichung der Immunsuppression begonnen wurde, noch vor Transplantation am Tag 0 eine deutliche Abweichung der Werte in allen Gruppen zu erkennen. Nach Transplantation steigt der Anteil am deutlichsten nach Injektion freier MPIOs in die A. gastroepiploica am Tag 2. Diese Zunahme ist gegenüber Tag -8 mit +91% signifikant (p < 0,05). Ebenso steigt der Anteil, wenn auch deutlich geringer, nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten via A. gastroepiploica um 7% gegenüber Tag 0. Die Applikationsrouten Milzparenchym (-54% gegenüber Tag 0) und Pfortader (-28%) rufen eine Abnahme des Anteils der CD4+ T-Effektorzellen am Tag 2 hervor. Während am Tag 7 die Werte der isolierten MPIO-Applikation via A. gastroepiploica wieder annähernd das präoperative Niveau von Tag 0 erreichen, steigt der Anteil bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über die genannte Route weiter an (+19% gegenüber Tag 2). Die Werte in den anderen beiden Applikationsgruppen sinken hingegen um jeweils -10% gegenüber Tag 2. Am Tag 14 wird in allen MPIO-markierten Hepatozytenapplikationsgruppen ein sprunghafter

Anstieg des Anteils der CD4+ T-Effektorzellen gegenüber Tag 7 deutlich: via A. gastroepiploica um 48%, via Mizparenchym um 82% und via Pfortader um 36%, jeweils ohne Signifikanz.

4.2.2.5 Veränderungen im Anteil der CD8+ Effektor-T-Zellen

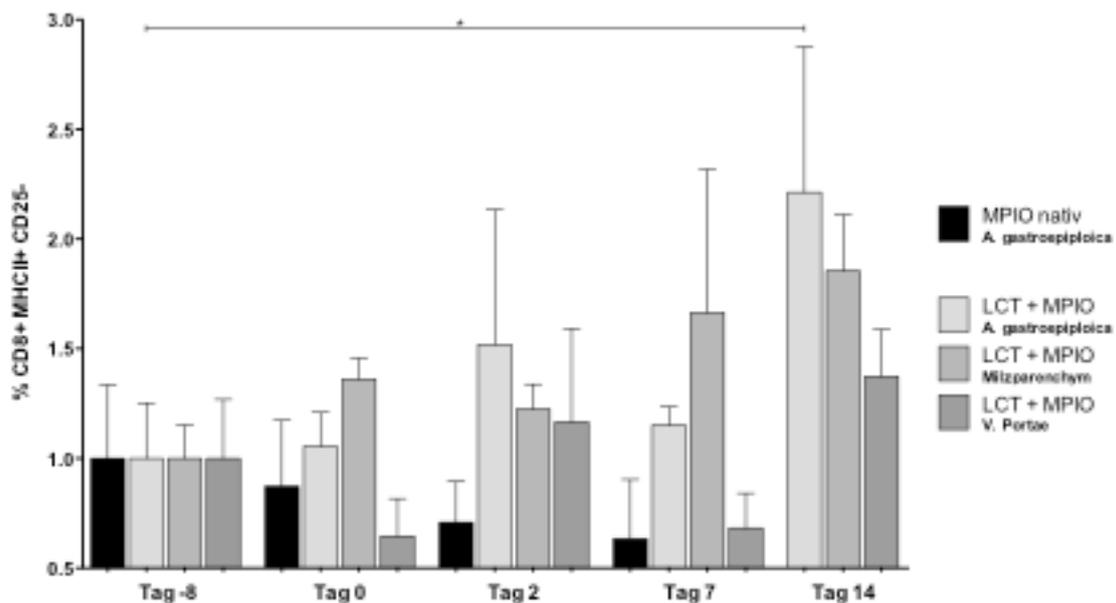


Abbildung 19: Prozentuales Verhalten der anteiligen MHCII+CD25- Zellen an den CD8+ Zellen nach FACS-Analyse bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Mizparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica. *p < 0,05.

Die Werte der CD8+ T-Effektorzellen (MHCII+CD25-) starten von unterschiedlichen Ausgangsniveaus am Tag 0. Die Injektion freier MPIOs in die A. gastroepiploica bewirkt eine kontinuierliche postoperative Abnahme der CD8+ T-Effektorzellen (-36% Tag 7 gegenüber Tag -8). Nach Applikation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica zeigt sich ein biphasischer Verlauf mit zwei sprunghaften Anstiegen: +46% Tag 2 gegenüber Tag 0 und +106% Tag 14 gegenüber Tag 7. Hierbei ist die Zunahme am Tag 14 im Vergleich zum Ausgangswert mit +121% signifikant (p < 0,05). Ebenso fallen in der Pfortadergruppe zwei sprunghafte Anstiege auf: zunächst am Tag 2 um 52% gegenüber Tag 0 und am Tag 14 um 70% gegenüber Tag 7. Die Milzparenchymroute ruft ab Tag 2 einen kontinuierlichen Anstieg des Anteils der CD8+ T-Effektorzellen hervor: +86% am Tag 14.

4.2.2.6 Veränderungen im Anteil der CD3- MHC II+ Nicht-T-Zellen

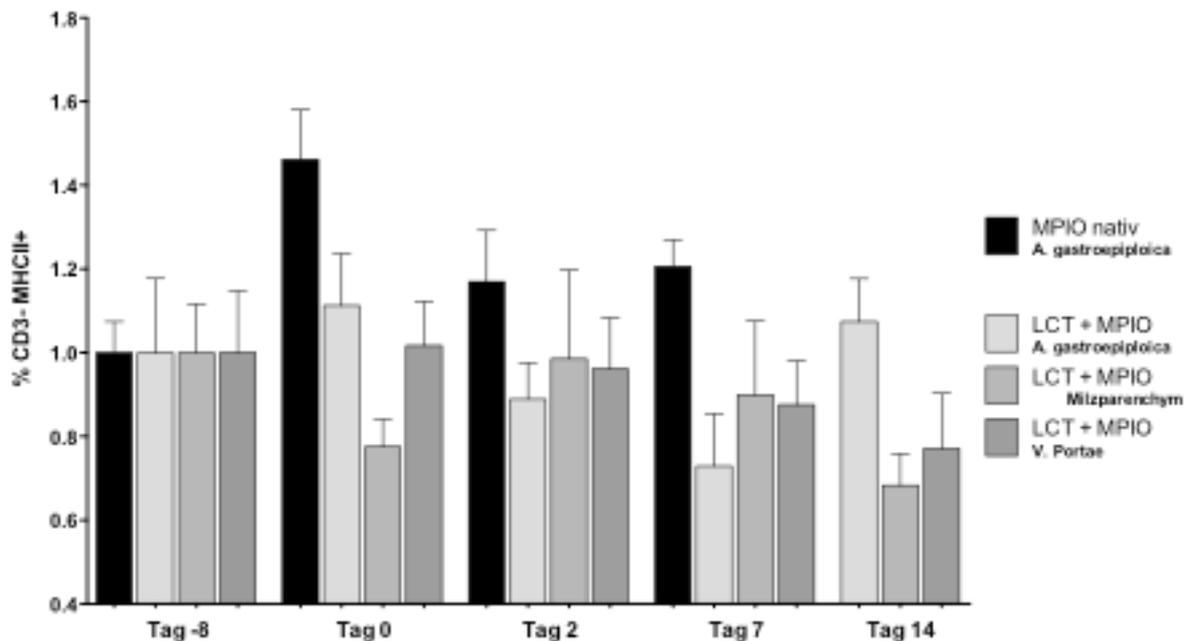


Abbildung 20: Prozentuales Verhalten der anteiligen MHCII+ Zellen an den CD3- Zellen bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica.

Die Ausgangswerte bezüglich des Anteils von MHC II+ Zellen an den CD3- Zellen weichen am Tag 0 in allen Gruppen voneinander ab. Postoperativ fällt auf, dass die Injektion freier MPIOs in die A. gastroepiploica eine anhaltende Zunahme bewirkt (am Tag 7 +21%). Die Applikation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica führt bis zu Tag 7 zu einer Abnahme des Anteils (-38% gegenüber Tag 0). Zuletzt kommt es am Tag 14 wieder zu einem Anstieg des Anteils der MHCII+CD3- Zellen um 34% nach intraarterieller Applikation MPIO-markierter Hepatozyten. Demgegenüber zeigt sich nach Applikation MPIO-markierter Hepatozyten über die anderen beiden Routen eine postoperative zunehmende Abnahme: bei Milzparenchymapplikation am Tag 14 um 32%, bei Pfortaderzugang am Tag 14 um 23%.

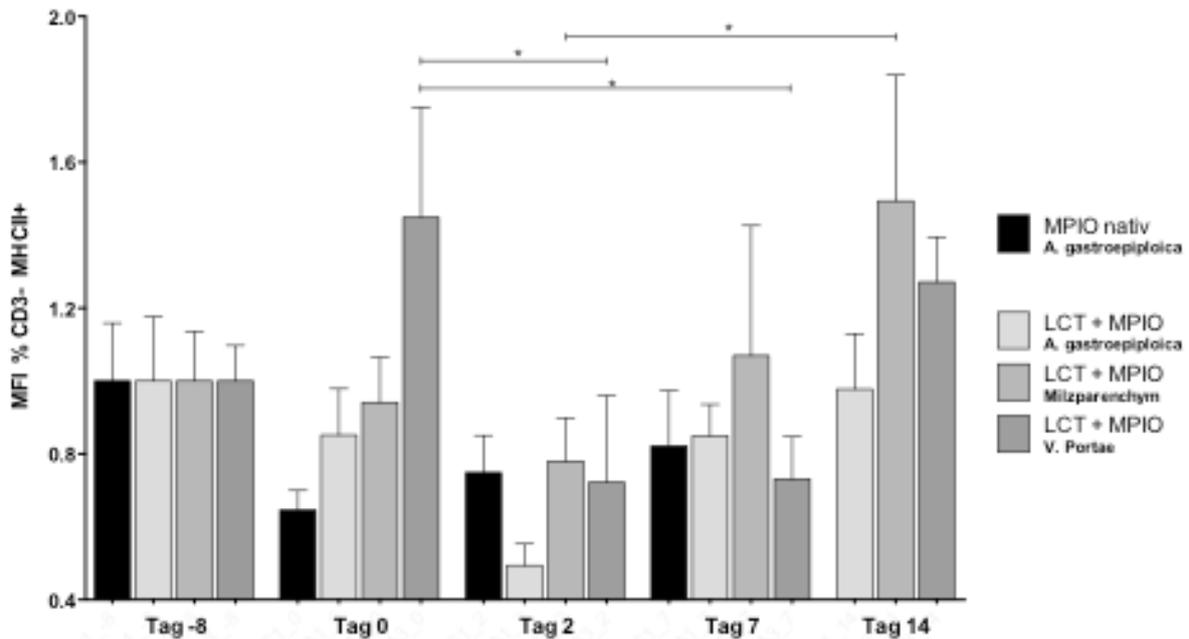


Abbildung 21: MFI der MHCII+CD3- Zellen bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten (LCT+MPIO) über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die V. portae sowie freier MPIOs (MPIO nativ) über die A. gastroepiploica. Die Messungen zeigen die präoperativen Tage -8 und 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Die präoperativen Werte von Tag -8 wurden auf 100% normiert, im Zeitverlauf sind Veränderungen bezogen auf Tag -8 = 100% aufgezeigt. Am präoperativen Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM aus n = 3-5 pro Applikationsweg bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten und n = 4 bei Injektion von isolierten MPIOs in die A. gastroepiploica. *p < 0,05.

Die MFI der MHCII+CD3- Nicht-T-Zellen weicht am Tag 0 in allen Gruppen deutlich voneinander ab. Nach Transplantation sinkt am Tag 2 die MFI in allen Gruppen, am deutlichsten nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica (-51%). Bei der Pfortaderroute fällt am Tag 0 ein deutlicher Anstieg auf, obwohl die Tiere lediglich immunsupprimiert wurden und keine weitere Manipulation bis dahin stattfand. Die daraufhin abnehmende MFI ist am Tag 2 (-73%) und Tag 7 (-72%) gegenüber Tag 0 signifikant unterschiedlich (p < 0,05). Am Tag 7 nimmt die MFI in allen Gruppen mit dem größten Sprung um 36% nach intraarterieller Applikation MPIO-markierter Hepatozyten zu. Eine weitere Zunahme lässt sich am Tag 14 in allen MPIO-markierten Hepatozytengruppen erkennen. Dabei erreichen die Werte der intraarteriellen Applikationsroute annähernd ihr Ausgangsniveau, während sie bei den anderen beiden Routen deutlich über das jeweilige Ausgangsniveau ansteigen. Hierbei ist die Zunahme bei Milzparenchymapplikation zwischen Tag 2 und 14 mit +71% signifikant (p < 0,05). Die Applikation isolierter MPIOs via A. gastroepiploica bewirkt postoperativ tendenziell eine Zunahme der MFI, verglichen mit dem Wert von Tag 0, jedoch bezogen auf den Ausgangswert von Tag -8 eine anhaltende Abnahme.

4.2.3 Zusammenfassung der prozentualen Veränderungen von Lymphozytensubpopulationen bei Transplantation MPIO-markierter Leberzellen im Vergleich zu Kontrollgruppen

Die Transplantation von MPIO-markierten Hepatozyten führt zum Anstieg der CD4+ und CD8+ T-Effektorzellen. Eine Ausnahme bildet die Pfortaderapplikationsroute. Hier resultiert zwar ein Anstieg der CD8+ T-Effektorzellen, die CD4+ T-Effektorzellen erreichen jedoch annähernd ihr Ausgangsniveau. Der prozentuale Anteil der MHC II+ Zellen an den Nicht-T-Zellen sinkt nach Applikation via Milzparenchym und Pfortader, während die MFI derselbigen steigt.

Im Vergleich dazu zeigt sich in der Kontrollgruppe der nativen Hepatozyten, dass die CD4+ T-Effektorzellen in allen 3 Applikationsgruppen steigen, die CD8+ T-Effektorzellen ebenso, aber nur gering im Vergleich zu den präoperativen Werten von Tag -8 und Tag 0. Auf den Anteil der MHC II+ Zellen an den Nicht-T-Zellen hat die Transplantation von nativen Hepatozyten keinen Einfluss; es werden nach 14 Tagen die Ausgangsniveaus erreicht. Die MFI der MHC II+CD3- Zellen sinkt in den 3 Applikationsgruppen.

Die Transplantation von isolierten MPIOs via A. gastroepiploica bewirkt einen Anstieg des Anteils der CD4+ T-Effektorzellen. Der Anteil der CD8+ T-Effektorzellen sinkt. Während die Werte der MHC II+ Nicht-T-Zellen steigen, sinkt die MFI der MHC II+ Nicht-T-Zellen.

Transplantat	Applika-tions- route	CD3+	CD4+	CD8+	CD4+ T- Effektorzellen	CD8+ T- Effektorzellen	MHCII+ CD3-	MFI von MHCII+ CD3-
MPIO+Hepa- tozyten	A. gastro- epiploica	=	↓ -8%	↑ +4%	↑ +83%	↑* ^c +121%	=	=
	Milz- parenchym	↓ -14%	↓* ^a -12%	↑* ^a +5%	↑ +67%	↑ +86%	↓ -32%	↑* ^d +49%
	Pfortader	↓ -20%	↓ -8%	↑ +4%	=	↑ +38%	↓ -23%	↑ +27%
Native Hepatozyten	A. gastro- epiploica	↓ -8%	↓ -14%	↑ +5%	↑ +126%	↑ +30%	=	↓ -34%
	Milz- parenchym	↑ +7%	↓ -22%	↑ +5%	↑ +116%	↑ +38%	=	↓ -33%
	Pfortader	=	=	↓ -3%	↑ +42%	↑ +19%	=	↓ -52%
MPIOs	A. gastro- epiploica	↑ +11%	↓ -21%	↑ +11%	↑* ^b +14%	↓ -36%	↑ +21%	↓ -18%

Tabelle 2: Zusammenfassung der prozentualen Veränderungen von Lymphozytensubpopulationen nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über A. gastroepiploica, Milzparenchym und Pfortader

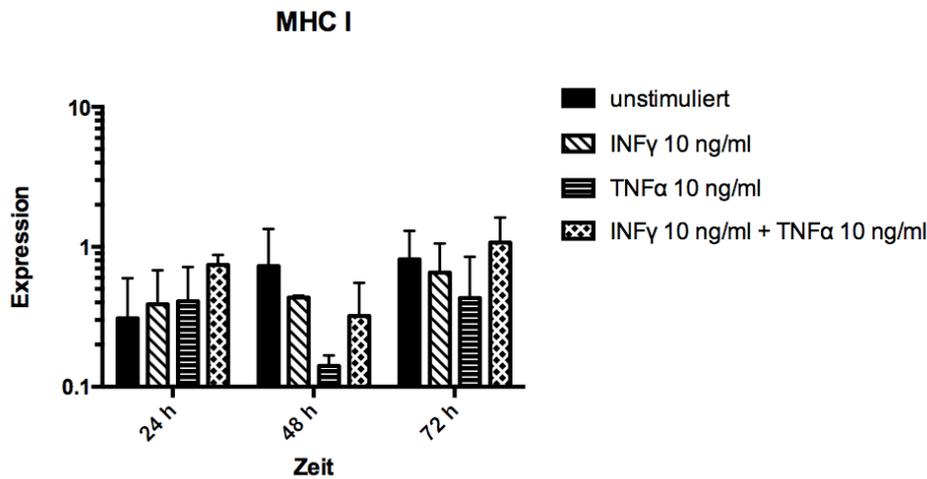
sowie nativer Hepatozyten über die gleichen Applikationsrouten. Isolierte MPIOs wurden nur über die A. gastroepiploica appliziert. Der nach oben gerichtete Pfeil ↑ zeigt angestiegene Werte am Tag 14 im Vergleich zu präoperativen Werten an. Der nach unten gerichtete Pfeil ↓ zeigt erniedrigte Werte am Tag 14 im Vergleich zu präoperativen Werten an. Nur minimale bis keine Veränderungen am Tag 14 im Vergleich zu präoperativen Werten werden durch = dargestellt. *p < 0,05 als Vergleich zwischen a = Tag 7 gegen Tag 14, b = Tag 0 gegen Tag 2, c = Tag 0 gegen Tag 14, d = Tag 2 gegen Tag 14.

4.3 *In vitro* Stimulation der MHC-Expression auf porcinen Hepatozyten

Um eine Aussage über die Immunogenitätseigenschaften von Schweinehepatozyten treffen zu können, wurde ein *in vitro* Versuchsaufbau mit der Fragestellung gewählt, in wie weit die porcinen Hepatozyten nach Stimulation mit Zytokinen mit einem Anstieg der Expression von MHC I- und MHC II-Molekülen reagieren. Dafür wurden die Hepatozyten nach ihrer Isolierung in Zellkulturplatten ausgesät und mit den Zytokinen INF γ und TNF α in unterschiedlicher Konzentration stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Hepatozyten. Die RNA wurde jeweils nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubationszeit isoliert. Anschließend erfolgte die cDNA-Umschreibung und TaqMan® - PCR mit den Primern MHC I und MHC II und HPRT1 als Referenzgen. Es wurden die Mittelwerte nach Δ CT-Methode und deren Standardabweichungen aus n=4 ermittelt.

4.3.1 Nachweis der MHC I-Expression

A



B

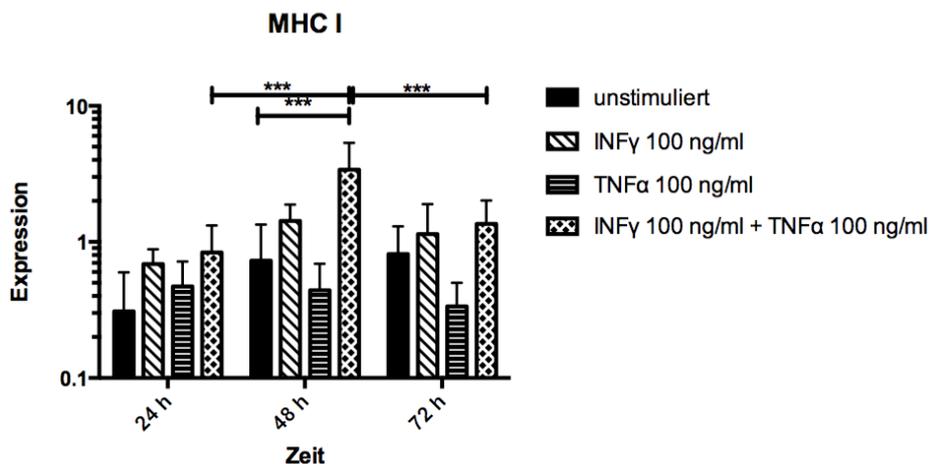


Abbildung 22: Durch die TaqMan-PCR analysierte Expressionsrate von MHC I auf porcinen Hepatozyten nach *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen INF γ und TNF α jeweils in der Konzentration A) 10 ng/ml und B) 100 ng/ml sowie in Kombination beider Zytokine in den genannten Konzentrationen für 24, 48 und 72 h Inkubationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus $n = 4$. *** $p \leq 0,001$. Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen pro Zeiteinheit wurden bis auf den Vergleich zur unstimulierten Probe vernachlässigt.

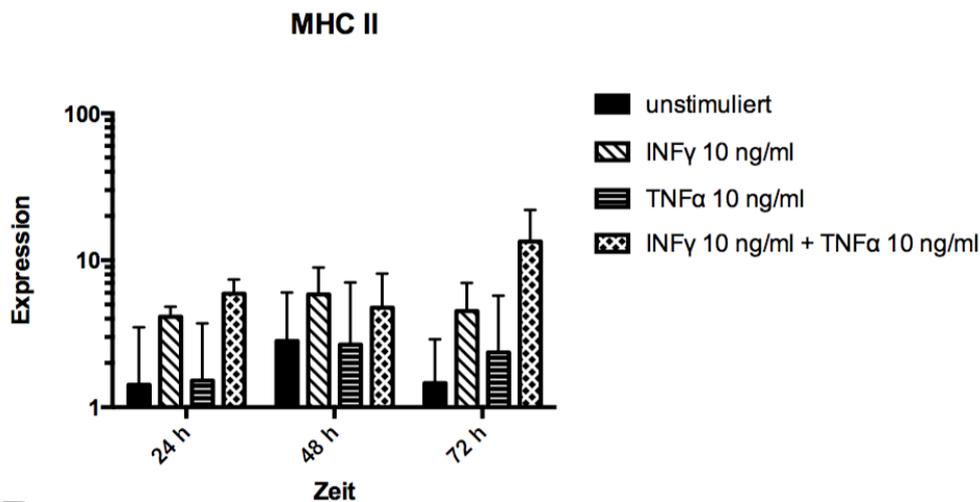
Im Vergleich zu unstimulierten Hepatozyten zeigt sich nach 24-stündiger Inkubationsdauer ein Anstieg der Expressionsrate von MHC I nach Stimulation mit beiden Zytokinen in beiden Konzentrationen. Am deutlichsten fällt er nach Inkubation mit INF γ 100 ng/ml und INF γ + TNF α jeweils 10 ng/ml und INF γ + TNF α jeweils 100 ng/ml aus. Nach 48-stündiger Inkubationszeit ist im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nur noch eine Zunahme der Expressionsrate nach Stimulation mit INF γ 100 ng/ml sowie mit INF γ 100ng/ml + TNF α 100ng/ml zu verzeichnen. Letztere ist hoch signifikant ($p \leq 0,001$). Die gleiche Entwicklung gilt für die 72-stündige Inkubation. Hierbei bewirkt neben INF γ 100ng/ml und INF γ 100ng/ml + TNF α 100ng/ml auch die

Kombination aus INF γ 10ng/ml und TNF α 10ng/ml einen Anstieg vergleichend zur Probe ohne Zytokinzusatz. TNF α alleine hat in keiner Konzentration einen verstärkenden Einfluss auf die Expression von MHC I.

Während die Expression über die Zeit betrachtet in der unstimulierten Probe abhängig von der Inkubationsdauer kontinuierlich ansteigt, wie es sich auch bei INF γ 10 ng/ml darstellt, bewirken die anderen Zytokinkonzentrationen und –kombinationen ein diskontinuierliches Verhalten. So sinkt die Expression nach 48-stündiger Inkubation mit TNF α 10 ng/ml und mit INF γ 10 ng/ml + TNF α 10 ng/ml im Vergleich zur Expression nach 24 Stunden Inkubation. Zu einem Anstieg kommt es hier nach 72 Stunden, wobei die Expression annähernd die 24-Stunden-Werte erreicht. In der Gruppe TNF α 100 ng/ml nimmt die Expression unabhängig von der Inkubationsdauer nicht zu. Die Stimulation mit INF γ 100 ng/ml bewirkt nach 48 Stunden und nach 72 Stunden eine zunehmende Expressionsrate im Vergleich zur 24-stündigen Inkubationsdauer. Der Anstieg der MHC I-Expression nach Stimulation mit INF γ 100ng/ml + TNF α 100ng/ml nach 48 Stunden Inkubationszeit ist hoch signifikant im Vergleich zur 24-stündigen Inkubationszeit ($p \leq 0,001$). Demgegenüber ist die Expressionsabnahme nach 72 Stunden im Vergleich zu 48 Stunden Inkubation ebenso hoch signifikant ($p \leq 0,001$).

4.3.2 Nachweis der MHC II-Expression

A



B

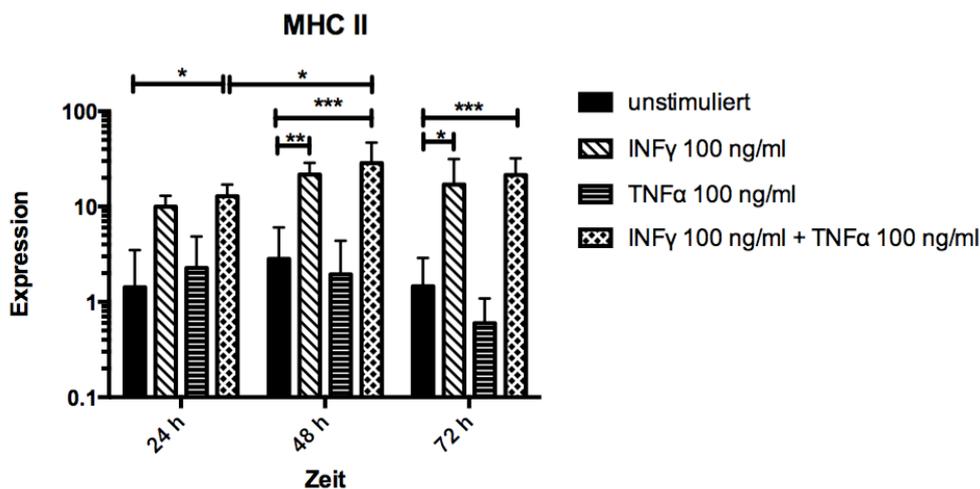


Abbildung 23: Durch die TaqMan-PCR analysierte Expressionsrate von MHCII auf porcinen Hepatozyten nach *in vitro* Stimulation mit den Zytokinen INF γ und TNF α jeweils in der Konzentration A) 10 ng/ml und B) 100 ng/ml sowie in Kombination beider Zytokine in den genannten Konzentrationen für 24, 48 und 72 h Inkubationszeit. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus n = 4. ***p \leq 0,001, **p \leq 0,01, *p \leq 0,05. Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen pro Zeiteinheit wurden bis auf den Vergleich zur unstimulierten Probe vernachlässigt.

Die Stimulation der Hepatozyten führt in allen Gruppen bis auf TNF α 10 ng/ml zu einer vermehrten Amplifikation von MHC II im Vergleich zu unstimulierten Zellen nach 24 Stunden Inkubationsdauer. Dabei ist der Anstieg bei Stimulation mit INF γ 100 ng/ml + TNF α 100 ng/ml signifikant (p \leq 0,05). Nach 48 Stunden Inkubation steigen die Expressionsraten vergleichend zur unstimulierten Kontrolle in allen Gruppen mit INF γ . Die Zunahme ist bei Stimulation mit INF γ 100 ng/ml sehr signifikant (p \leq 0,01), bei Stimulation mit INF γ 100ng/ml + TNF α 100ng/ml hoch signifikant (p \leq 0,001). TNF α bewirkt in beiden Konzentrationen keine Zunahme der MHC II-Expressionsrate. Eine ähnliche Dynamik zeigt sich auch nach 72 Stunden

Inkubation: INF γ alleine oder in Kombination führt im Vergleich zur Negativkontrolle zur Expressionszunahme, wobei diese bei Stimulation mit INF γ 100 ng/ml signifikant ist ($p \leq 0,05$) und bei Stimulation mit INF γ 100 ng/ml + TNF α 100 ng/ml hoch signifikant ausfällt ($p \leq 0,001$). TNF α alleine erzielt keinen Effekt.

Die Inkubationsdauer hat bei der unstimulierten Probe und bei Stimulation mit INF γ 10 ng/ml und TNF α 10 ng/ml keinen nennenswerten Effekt auf die Expressionsrate. Dahingegen steigt die Expression in Proben mit Zusatz von INF γ 100 ng/ml, INF γ 10 ng/ml + TNF α 10 ng/ml und INF γ 100ng/ml + TNF α 100ng/ml nicht nur im Vergleich zur Negativkontrolle, sondern auch abhängig von der Inkubationszeit. Die Zunahme ist bei den Proben mit Zugabe von INF γ 100ng/ml + TNF α 100ng/ml zwischen dem 24-h- und 48-h-Wert signifikant ($p \leq 0,05$). TNF α 100ng/ml bewirkt auch nach 72 Stunden keinen Anstieg der Expression, sondern eher eine Abnahme verglichen mit dem 24-h-Wert.

4.4 Auswirkungen der Leberzelltransplantation auf klinische Parameter

Für die laborchemische Untersuchung des CiclosporinA-Spiegels, der Leberzellschädigungsparameter (Alanin-Aminotransferase, Aspartat-Aminotransferase) und Lebersyntheseparameter (Harnstoff, Albumin) erfolgten Blutentnahmen am Tag 0 präoperativ sowie postoperativ an den Tagen 2, 7 und 14. Das Enzym Alanin-Aminotransferase (ALT) kommt v.a. in der Leber vor, während Aspartat-Aminotransferase (AST) neben der Leber auch in der Muskulatur zu finden ist. Da ALT innerhalb der Zelle im Zytosol lokalisiert ist, kommt es schon bei leichteren Zellschäden zum Übertritt ins Blut. Dahingegen befindet sich die AST v.a. in den Mitochondrien. Ein Anstieg dieses Enzyms im Blut zeigt daher einen vollständigen Zellschaden an. Die Harnstoff- und Albuminsynthese sind Ausdruck der Leberleistung, wobei letzterer Parameter u.a. auch in den Child-Pugh-Score zur Stadieneinteilung bei Leberzirrhose eingeht.

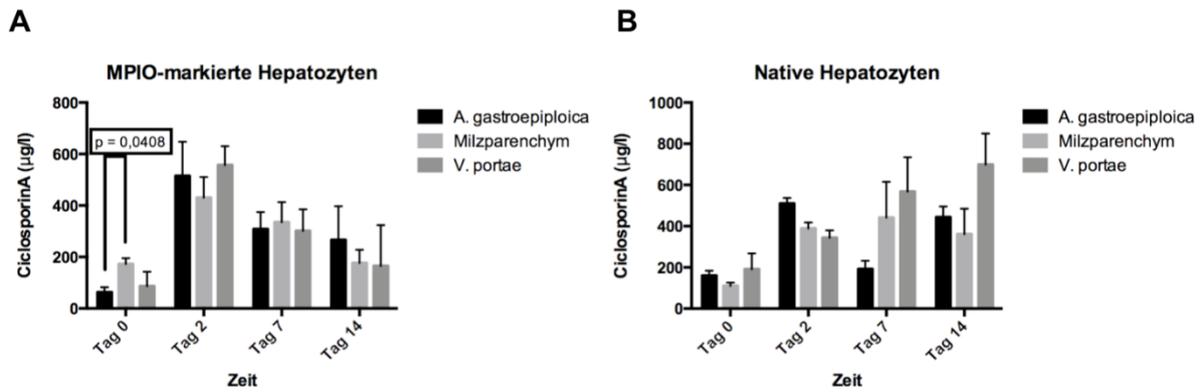


Abbildung 24: CiclosporinA-Serumspiegel der Empfängertiere von A) MPIO-markierten Hepatozyten und B) nativen Hepatozyten als Vergleich der 3 Applikationswege und über die Zeit dargestellt. Die Messungen zeigen den präoperativen Tag 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Am Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mediane und SEM aus A) $n = 3-5$ pro Applikationsweg und B) $n = 2$ pro Applikationsweg. $p < 0,05$. Signifikanzen im zeitlichen Verlauf wurden vernachlässigt.

Der CiclosporinA-Serumspiegel (Abb. 24A) differiert bei den Tieren, denen MPIO-markierte Hepatozyten transplantiert wurden, am Tag 0 zwischen intraarterieller und intrasplenischer Route signifikant ($p \leq 0,5$). Spiegelspitzen zeigen sich bei Transplantation MPIO-markierter Leberzellen am Tag 2, bei Transplantation nativer Hepatozyten (Abb. 24B) am Tag 2 und Tag 14 sowie bei intrasplenischer und intraportaler Applikation der Hepatozyten am Tag 7.

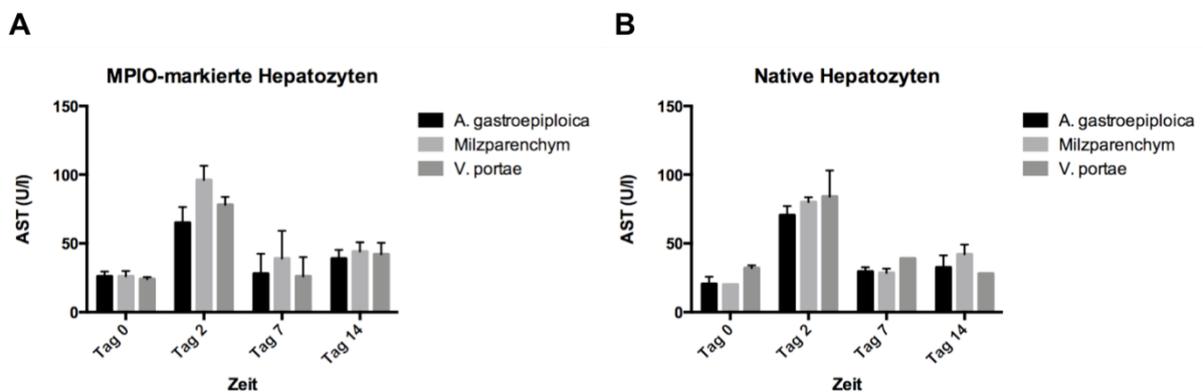


Abbildung 25: AST-Serumspiegel der Empfängertiere von A) MPIO-markierten Hepatozyten und B) nativen Hepatozyten als Vergleich der 3 Applikationswege und über die Zeit dargestellt. Die Messungen zeigen den präoperativen Tag 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Am Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mediane und SEM aus A) $n = 3-5$ pro Applikationsweg und B) $n = 2$ pro Applikationsweg. $p < 0,05$. Signifikanzen im zeitlichen Verlauf wurden vernachlässigt.

Der Leberzellschädigungsparameter AST steigt transplantationsassoziiert sowohl bei Transplantation markierter (Abb. 25A) als auch nativer Hepatozyten (Abb. 25B) unabhängig von der Applikationsroute 2 Tage nach LCT. Anschließend sinken die Werte in beiden Versuchsgruppen. In der markierten Gruppe zeigen sich im

Vergleich zum Ausgangswert am Tag 14 leicht erhöhte Werte. Signifikante Unterschiede bezüglich des AST-Serumspiegels zwischen den Applikationsrouten bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten liegen nicht vor ($p > 0,5$; t-test und Wilcoxon-Test).

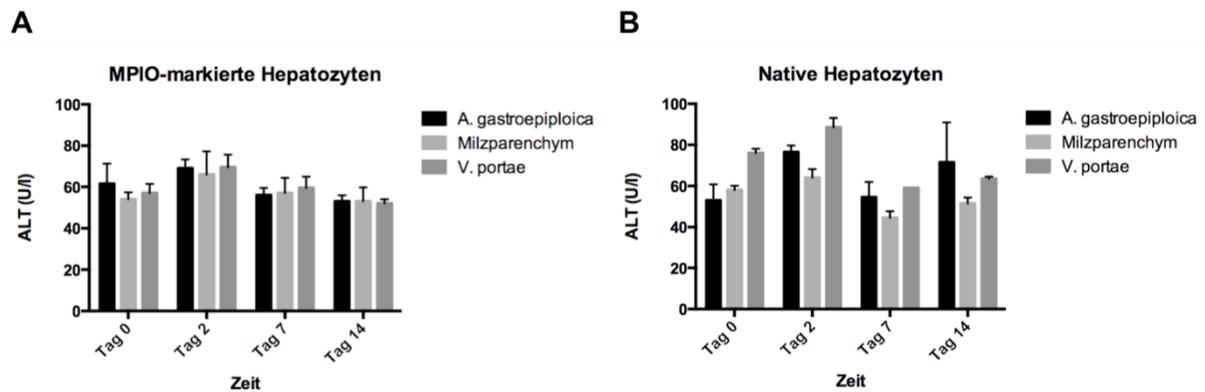


Abbildung 26: ALT-Serumspiegel der Empfängertiere von A) MPIO-markierten Hepatozyten und B) nativen Hepatozyten als Vergleich der 3 Applikationswege und über die Zeit dargestellt. Die Messungen zeigen den präoperativen Tag 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Am Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mediane und SEM aus A) $n = 3-5$ pro Applikationsweg und B) $n = 2$ pro Applikationsweg. $p < 0,05$. Signifikanzen im zeitlichen Verlauf wurden vernachlässigt.

ALT als weiterer Enzymmarker einer Leberzellschädigung steigt bei Transplantation eisenmarkierter Hepatozyten am Tag 2 leicht an und fällt an den weiteren postoperativen Tagen wieder ab (Abb. 26A). Bei Transplantation nativer Hepatozyten zeigt sich das gleiche Verhalten mit Persistenz der Erhöhung bei der intraarteriellen Route (Abb. 26B). Signifikante Unterschiede liegen nicht vor ($p > 0,05$; t-test und Wilcoxon-Test).

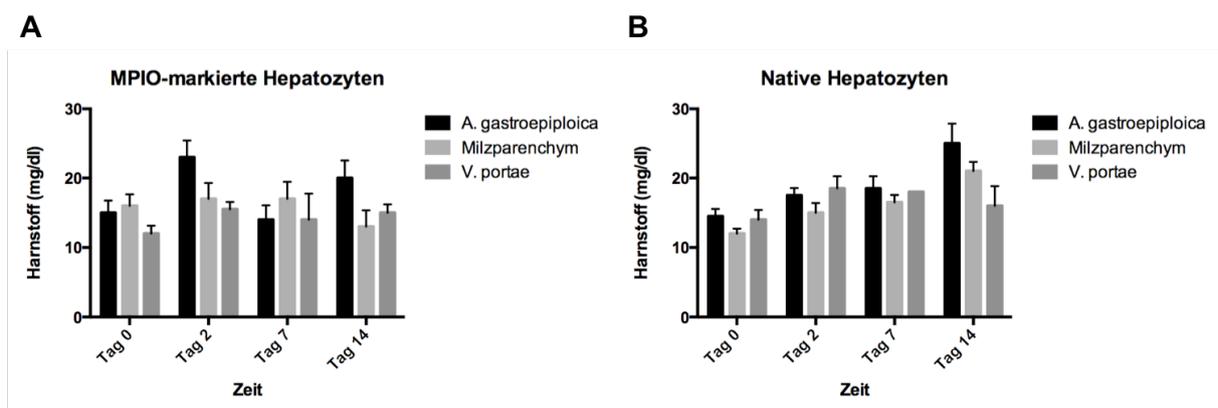


Abbildung 27: Harnstoff-Serumspiegel der Empfängertiere von A) MPIO-markierten Hepatozyten und B) nativen Hepatozyten als Vergleich der 3 Applikationswege und über die Zeit dargestellt. Die Messungen zeigen den präoperativen Tag 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Am Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mediane und SEM aus A) $n = 3-5$ pro Applikationsweg und B) $n = 2$ pro Applikationsweg. $p < 0,05$. Signifikanzen im zeitlichen Verlauf wurden vernachlässigt.

Der Lebersyntheseparameter Harnstoff steigt bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten nach Applikation via A. gastroepiploica am Tag 2 und 14, während die anderen beiden Applikationsrouten keine größeren Veränderungen hervorrufen (Abb. 27A). Über das Milzparenchym applizierte MPIO-markierte Hepatozyten bewirken am Tag 14 eine leichte Abnahme der Synthese verglichen mit dem Ausgangswert. Bei Transplantation nativer Leberzellen wird postoperativ ein kontinuierlicher Anstieg des Harnstoffserumspiegels deutlich, der nach intraarterieller Applikation am größten ist (Abb. 27B). Signifikanzen zwischen den Applikationsrouten in der MPIO-markierten Gruppe lassen sich nicht erheben ($p > 0,5$; t-test und Wilcoxon-Test).

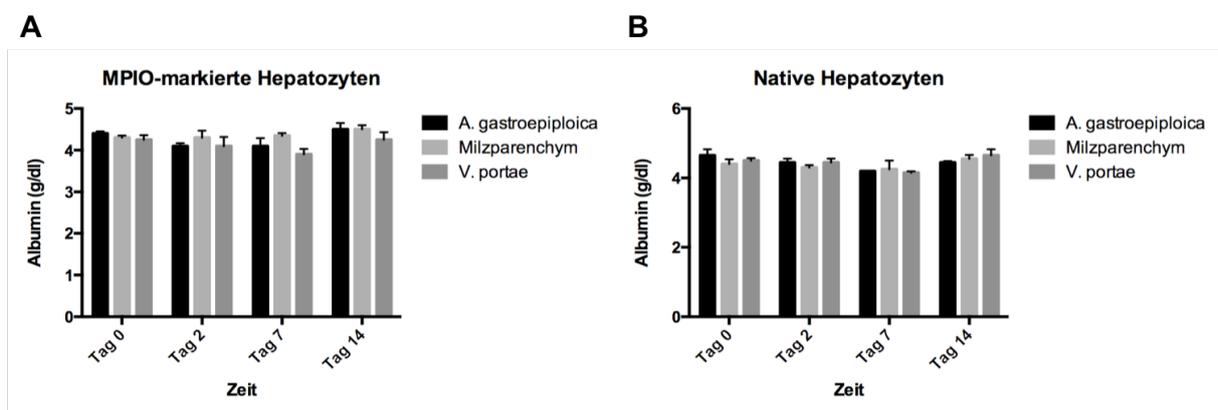


Abbildung 28: Albumin-Serumspiegel der Empfängertiere von A) MPIO-markierten Hepatozyten und B) nativen Hepatozyten als Vergleich der 3 Applikationswege und über die Zeit dargestellt. Die Messungen zeigen den präoperativen Tag 0 sowie die postoperativen Tage 2, 7 und 14. Am Tag 0 sind die Tiere bereits immunsupprimiert. Dargestellt sind Mediane und SEM aus A) $n = 3-5$ pro Applikationsweg und B) $n = 2$ pro Applikationsweg. $p < 0,05$. Signifikanzen im zeitlichen Verlauf wurden vernachlässigt.

Albumin als Lebersyntheseparameter zeigt sowohl bei Transplantation MPIO-markierter (Abb. 28A) als auch bei Transplantation nativer Leberzellen (Abb. 28B) keine größeren transplantationsassoziierten Veränderungen. Der größte vorübergehende Abfall lässt sich bei Transplantation eisenmarkierter Hepatozyten via Pfortader am Tag 7 erkennen, jedoch liegen auch hier keine signifikanten Differenzen der Albuminwerte zwischen den Applikationsrouten in der MPIO-markierten Gruppe vor ($p > 0,05$; t-test und Wilcoxon-Test).

4.5 Komplikationen

Bei der Leberzelltransplantation besteht das Risiko von intraoperativen und postoperativen Komplikationen. Insbesondere erhöht die nötige Immunsuppression das Infektionsrisiko. Die Sektion der Tiere nach 14 Tagen ergab bei einem Tier, dem Zellen über die Pfortader appliziert wurden, die operativ bedingte Bridenbildung der Milz. Zeichen eines Milzinfarktes der Tiere bestanden weder makro- noch

mikroskopisch. Bildgebend (MRT) zeigte sich an Tag 7 und 14 postoperativ bei 30% der transplantierten Tiere eine hämodynamisch nicht relevante Pfortaderteilthrombose nach intrasplenischer und intraportaler Applikation⁹⁷, die klinisch keine Auffälligkeiten hervorrief. In der durchflusszytometrischen Analyse fiel bei einem Tier eine CD4-Immundefizienz auf. Diese wirkte sich trotz LCT klinisch nicht negativ auf das Tier aus. Zusammenfassend bestanden in der gesamten Kohorte keine wesentlichen klinischen Komplikationen, die Pfortaderteilthrombosen blieben ohne klinisch messbaren Effekt.

5. Diskussion

5.1 Immunogenität allogener Hepatozyten

Die Markierung von Leberzellen mit Eisenoxidpartikeln offenbart eine potente Möglichkeit zur magnetresonanztomographischen Visualisierung *in vivo* nach klinischer Leberzelltransplantation. Für die Untersuchung der immunologischen Reaktionen auf transplantierte MPIO-markierte Hepatozyten sowie der Leberzelldetektierbarkeit mittels MRT bedurfte es eines Modells, das anatomisch, physiologisch und immunologisch dem menschlichen Organismus nahe kommt. Das Schwein erfüllt diese Voraussetzungen und dient folglich in der experimentellen Transplantationsforschung häufig als Versuchstier⁹⁹. Dennoch stehen bei diesen Studien selten die immunologischen Gegebenheiten und Unterschiede im Vergleich zum humanen Immunsystem im Fokus der Betrachtung, weil für diese Fragestellungen Kleintiermodelle bevorzugt werden^{91, 100, 101, 102}. Deshalb müssen diese mehr oder weniger bekannten Besonderheiten des porcinen Immunsystems^{103, 104} wie beispielsweise die zusätzlichen T-Lymphozytensubpopulationen CD4-CD8- sowie CD4+CD8+ T-Zellen¹⁰⁵ bei der Bewertung von Ergebnissen und deren Übertragung in die klinische Anwendung berücksichtigt werden.

5.1.1 Leberzellisolierung, Zellzahl und –viabilität

Die Leberzelltransplantation verspricht großes Potential zu haben, um dem Problem der zurückhaltenden Spendenbereitschaft und begrenzten Verfügbarkeit adäquater Organe zu begegnen. Es ist bekannt, dass für einen langfristigen Erfolg dieser Therapie Zellzahlen von mindestens 5×10^8 mit einer Viabilität von >60% erreicht werden müssen⁵, was ungefähr 5% der durchschnittlichen Lebermasse entspricht¹⁰⁶. Unsere Zellzahlen lagen im Schnitt um etwas weniger als eine Potenz unter der Zielvorgabe. Andererseits ist die Spannbreite mit 10^7 und 10^{10} Zellen, die bei klinischer LCT in der Vergangenheit transplantiert wurden, relativ weit³⁰. Der Zellverlust nach Kultivierung der Hepatozyten könnte einerseits dadurch bedingt sein, dass nach Aussäen der Zellen in Zellkulturflaschen nicht alle Hepatozyten adhärten und andererseits Zellen der enzymatischen Adhärenzlösung vom Kulturflaschenboden widerstanden. Ähnlich verhielt es sich mit der Zellviabilität, die direkt nach Leberzellisolierung mit 77,5% zwar im Zielbereich lag, nach Kultivierung und Inkubation mit MPIOs jedoch auf $49,5 \pm 2\%$ sank. Da die Viabilität in der Kontrollgruppe der nativen Hepatozyten nach Kultivierung und Trypsinierung zur

Adhäsionslösung sogar mit $37,8 \pm 1,3\%$ niedriger war, kann geschlussfolgert werden, dass die MPIO-Markierung keine negativen Auswirkungen auf die Hepatozytenviabilität hat, sondern Zellverluste eher auf die bei diesem Protokoll notwendige Resuspension und Trypsinierung zur Adhäsionslösung der Kultur zurückzuführen sind. Hinsichtlich der transplantierten Zellzahl gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen MPIO-markierten Hepatozyten und nativen Hepatozyten, auch wenn die Zellzahl bei letzteren niedriger war. Grund hierfür ist vermutlich die geringe Versuchsanzahl von 2 in der Gruppe der nativen Hepatozytentransplantation, so dass ein weniger gelungener Isolierungsprozess nicht ausgeglichen werden konnte. Die Zellen für die native LCT bei 6 Tieren entstammten 2 Leberzellisolierungsprozessen, von denen einer mit einer deutlich geringen Zellzahl als Ausreißer auffiel. Modifikationen des derzeitigen Isolierungsprozesses sind nötig, um eine bessere und konstantere Qualität und höhere Ausbeute nach Leberzellisolierung zu erzielen. Es ist denkbar, dass einer größeren Zahl transplantiert vitaler Hepatozyten, welche für den klinischen Erfolg gebraucht wird, auch andere Immunantworten des Rezipienten als die hier beleuchteten entgegenstehen. Andererseits ist zu beachten, dass gute Viabilitätsergebnisse in der Kleintierforschung nicht auf ein besseres Isolierungsprozedere zurückzuführen sein müssen, sondern Unterschiede auch durch andere Herausforderungen und Gegebenheiten beim Großtier erklärt werden können. So berichten *Puppi et al.* ebenso über das häufige Problem von insuffizienten vitalen Leberzellen beim Isolierungsprozess von menschlichen Hepatozyten⁵. Dass hier Verbesserungen und weitere Versuchsreihen nötig sind, zeigt die Tatsache, dass die Injektion nicht-vitaler Zellen das transplantationsassoziierte Risiko für eine Inflammation erhöht⁵⁷, bei der Zytokine ausgeschüttet werden, die wiederum co-stimulatorische Signale für die T-Zellaktivierung darstellen. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass enzymatische Vorgänge der Trypsinierung nicht nur negative Wirkungen auf die Viabilität haben, sondern auch Immunogenitätseigenschaften von Hepatozyten verändern können⁸⁷.

5.1.2 MHC-Expression auf Hepatozyten

Die Immunogenität von Hepatozyten wird vor allem über ihre MHC I- und MHC II-Expression auf der Zelloberfläche vermittelt, über die sie für das Rezipientenimmunsystem als „fremd“ erkennbar werden. Laut *Bumgardner et al.*

wiesen Mäusehepatozyten in der Immunfluoreszenzmikroskopie und der durchflusszytometrischen Analyse als kernhaltige Zellen nur das Oberflächenmolekül MHC I auf ⁸⁶. Diese These unterstützend waren Hepatozyten unfähig, die MHC II-gerichtete Proliferation eines allospezifischen T-Helferzellklons zu stimulieren ^{86, 101, 102}. Auch konnte durch Stimulation der Hepatozyten mit INF γ und TNF α nicht die Expression von MHC II induziert werden ^{86, 91, 100}. Analog dazu zeigten *in vitro* Studien, dass Mäusehepatozyten die Entwicklung von alloreaktiven zytotoxischen CD8+ T-Zellen stimulieren konnten, die von den Autoren auf die MHC I-Eigenschaften der Leberzellen zurückgeführt wird ¹⁰⁷. Die vermutete Beteiligung von CD4+ T-Zellen bei der Abstoßungskaskade kann nach Ausschluss einer MHC II-Expression nur über eigene APCs vermittelt werden, die Alloantigene der Hepatozyten den eigenen CD4+ T-Zellen präsentieren ⁸⁶. Im Gegensatz dazu gelang es *Fouzas et al.*, auf Rattenhepatozyten eine sehr geringe MHC II-Expression mittels FACS-Analyse zu detektieren ¹⁰⁸. *Arvieux et al.* betonen, dass native Hepatozyten normalerweise auf Grund ihrer moderaten MHC I- und fehlenden MHC II-Expression eine geringe Immunogenität aufweisen, diese jedoch im Rahmen einer Abstoßungsreaktion verändert werden kann, da Hepatozyten in einem Rattenmodell vermehrt MHC I exprimierten ¹⁰⁹. Humane native Hepatozyten lassen sich nicht durch das Oberflächenmolekül MHC II charakterisieren ¹¹⁰. Auf Hepatozyten aus transplantierten humanen Lebern konnte jedoch während Abstoßungsepisoden und viralen und bakteriellen Infekten mittels monoklonaler Antikörperbindung und immunhistologischer Methoden eine starke Induktion der MHC I- und MHC II-Antigene demonstriert werden ¹¹¹. In gleicher Weise argumentieren *Sundstrom et al.*. Sie unterstreichen die Fähigkeit vieler verschiedener Zelllinien als semiprofessionelle bzw. nonprofessionelle APCs zu agieren, indem neben der ohnehin vorhandenen MHC I-Oberflächenexpression auf fast allen somatischen Zellen auch die MHC II-Expression mittels proinflammatorischer Zytokine wie INF γ oder TNF α induziert werden kann ⁷¹. Unsere Ergebnisse der *in vitro* Versuche zur Bestimmung von MHC-Eigenschaften porciner Hepatozyten differieren von den genannten Thesen: Nach Leberzellisolierung zeigten die unstimulierten nativen Hepatozyten sowohl eine MHC I als auch sogar eine höhere MHC II-Expression (Abb. 22 und 23). Die Verstärkung dieser Expressionen durch das Zytokin INF γ in der Konzentration 100 ng/ml sowie in Kombination mit TNF α jeweils 10 ng/ml und jeweils 100 ng/ml in Kultur gelang für beide Oberflächenmoleküle. INF γ in der kleineren Konzentration (10 ng/ml) bewirkte

nur für MHC II eine Expressionszunahme. Zusammenfassend ließ sich die Expression von MHC I und –II nur durch das Zytokin INF γ steigern. In Kombination mit TNF α , beide in Konzentrationen von 100 ng/ml, lässt sich ein additiver Effekt von TNF α vermuten, da bei dieser Zytokinkombination signifikante Zuwächse zu verzeichnen waren (siehe 3.3.1 und 3.3.2). INF γ 100 ng/ml alleine hatte nicht diesen ausgeprägten Effekt, auch wenn hier signifikante Anstiege bezogen auf die MHC II-Expression nach 48 h und 72 h Inkubationszeit verglichen mit der Negativprobe auffielen. TNF α alleine bewirkte keine Expressionszunahme. Interessanterweise fiel die Induktion auf die MHC II-Expriemierung nach 24 h, 48 h und 72 h Inkubationszeit höher aus als jene auf die MHC I-Eigenschaften. Dieses Resultat lässt die Schlussfolgerung zu, dass transplantierte allogene porcine Hepatozyten ihre Immunogenität über eine Hochregulierung ihrer MHC II-Antigene durch inflammatorisch oder alloreaktiv bedingte INF γ -Ausschüttung steigern können. Infolgedessen agieren sie als nonprofessionelle APCs und bieten über ihre MHC II-Oberflächenmoleküle den geeigneten Liganden für den T-Zell-Rezeptor. Andererseits kann die unterschiedliche MHC I- und MHC II-Expression im Vergleich zu anderen Publikationen auch methodisch bedingt sein: Zum einen ist die über eine PCR nachgewiesene mRNA der MHC-Proteine nicht gleichbedeutend mit der Menge der Oberflächenmoleküle, zum anderen ist die Effizienz und somit die Aussagekraft des verwendeten kommerziellen Primer-Sonden-Paares nur über eine Standardkurve mittels Verdünnungsreihe der eingesetzten cDNA-Menge zu ermitteln, so dass unsere Ergebnisinterpretation diesbezüglich limitiert ist.

Überdies ist auch die indirekte Antigenerkennung denkbar. Es scheint demzufolge Unterschiede der MHC-Expression auf Hepatozyten bei Kleintieren, Großtieren und Menschen zu geben, wobei sich unsere Induktionsergebnisse der MHC-Expriemierung mit denen bei humanen Hepatozyten decken ¹¹¹. Das unterstreicht, dass das Schwein auf Grund der Ähnlichkeiten zum menschlichen Immunsystem als gutes Modell in der Transplantationsforschung dienen kann. Überträgt man die Ergebnisse auf die humane Leberzelltransplantation, die mit der Problematik der Abstoßung zu kämpfen hat, kann diese Immunogenität der Hepatozyten unter anderem durch ihre MHC II-Hochregulierung erklärt werden.

Die Interaktion zwischen dem MHC II-Molekül auf Hepatozyten und dem T-Zellrezeptor findet jedoch nur zwischen Hepatozyten und antigenspezifischen Effektorzellen statt. Zur Aktivierung von naiven T-Zellen sollen sie als

nonprofessionelle APCs nicht in der Lage sein ⁷¹. Je nachdem, unter welchem Zytokineinfluss primär aktivierte CD4+ T-Zellen stehen, wird ihre Entwicklung entweder in Richtung des Th1-Phänotyps, der in der zellvermittelten Immunantwort mündet oder des Th2-Phänotyps, der die humorale Immunantwort unterstützt, gelenkt. Es ist bekannt, dass APCs durch die von ihnen sezernierten Zytokine diese Entwicklungsrichtungen bestimmen können. Hepatozyten als nonprofessionelle APCs synthetisieren u.a. die Zytokine IL-1, IL-6 und IL-8 ⁷¹. Zusammenfassend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Hepatozyten durch ihre MHC II-Hochregulierung eine Immunantwort unterhalten und gleichzeitig durch die von ihnen ausgeschütteten Zytokine bestimmen, mit welchen Mechanismen des Empfängerimmunsystems sie bekämpft werden. Eine immunologische Toleranz entsteht u.a. bei Unfähigkeit der professionellen bzw. nonprofessionellen APCs, ihre MHC-Oberflächenmoleküle hochzuregulieren und allogene Peptide zu prozessieren und präsentieren ⁷¹. Hier könnte ein Angriffspunkt zur Minimierung der Immunogenität von Hepatozyten mit konsekutiv geringerem Abstoßungsrisiko nach LCT liegen.

5.2 Immunologische Reaktionen auf transplantierte MPIO-markierte Leberzellen

5.2.1 Immunsuppression

Die LCT ist häufig mit akutem Transplantatverlust im Sinne einer Abstoßung auf Grund von noch nicht gut verstandenen Immunmechanismen assoziiert. Da diese Mechanismen bei unserer Studie nicht im Fokus der Untersuchung lagen, sondern die immunologische Wirkung der MPIO-Markierung, wurden die Tiere bereits ab dem zweiten Tag vor LCT immunsupprimiert. Auch bei der klinischen LCT, für die die MPIO-Markierung als neuartiges Identifizierungsmittel für transplantierte Donorhepatozyten derzeit erforscht wird, ist die immunsuppressive Therapie unerlässlicher Bestandteil des Behandlungskonzepts ⁵. Daher ist die Ergebnisbewertung durch Fehlen einer unbehandelten Kontrollgruppe zum Teil limitiert und der Einfluss der Immunsuppression auf die Immunreaktionen kann nicht bemessen werden.

Die Ableitung der möglichen und nötigen Immunsuppressiva-Dosen für Minischweine ist nicht einfach, Erfahrungen aus größeren Serien fehlen bislang. *Frey et al.* berichten, dass Schweine auf Grund ihres größeren Distributionsvolumens, einer verstärkten Clearance und schwächeren systemischen Verfügbarkeit eine 2- bis 4-mal höhere intravenöse und orale CiclosporinA-Dosis und eine 10- bis 30-fache

intravenöse und orale Dosis an Steroiden brauchen, um die gleichen Plasmakonzentrationen wie beim Menschen zu erreichen ¹¹². In wie weit diese Angleichung der Konzentrationen auch nötig ist, lässt sich nicht sagen. Wir orientierten uns an Erfahrungen vorangegangener Studien mit Minischweinen ¹¹³, so dass wir die Dosis der Immunsuppressiva auf 5 mg/kg/KG CiclosporinA 2-mal täglich p.o. und 0,5 mg/kg/KG Prednisolon 2-mal täglich p.o. festsetzten.

Bis auf die OP- und Blutentnahmetage, an denen die CiclosporinA- und Prednisolon-Dosis i.m. bzw. i.v. verabreicht wurde, erwies sich die orale Gabe an den anderen Tagen teilweise als schwierig. Bei Tieren, die weniger zutraulich waren, gelang es bisweilen nicht, die volle Dosis oral über eine Spritze zu applizieren. Bei Verwendung von Nahrungsmitteln als Vektoren wurden diese zum Teil von anderen Tieren aufgenommen. Neben Gründen der individuellen Pharmakokinetik können sich dadurch Schwankungen der aus dem Blut ermittelten CiclosporinA-Spiegel erklären lassen. Dennoch wurde bei keinem Tier eine klinisch oder durch FACS-Analyse erkennbare akute Abstoßung während des Beobachtungszeitraums registriert. Die CiclosporinA-Spiegel (siehe Abb. 24) fielen mit Spiegelspitzen am Tag 2 bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten sowie am Tag 2 und 14 bei Transplantation nativer Hepatozyten auf. In Korrelation hierzu zeigten sich die CD4+MHCII+CD25⁻ und die CD8+MHCII+CD25⁻ T-Effektorzellen am Tag 2 bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten gar nicht bis moderat erhöht gegenüber den Ausgangswerten (siehe Abb. 11, 12). Erklärbar kann dies durch die hohen CiclosporinA-Spiegel an diesem Tag werden. Allerdings lässt sich bei Transplantation nativer Hepatozyten dieser Zusammenhang nicht eindeutig herleiten: hohe T-Zelleffektoranteile trotz hoher CiclosporinA-Serumspiegel. Insgesamt lässt dieses Ergebnis die Deutung zu, dass die Höhe des CiclosporinA-Spiegels nicht unbedingt mit dem Grad der Unterdrückung des Empfängerimmunsystems korreliert, ein *Ceiling*-Effekt ab einer bestimmten Plasmakonzentration einsetzt, d.h. dass trotz Dosissteigerung keine Zunahme der Wirkung folgt oder eine Immunantwort trotz hoher Dosen Immunsuppressiva nicht gänzlich unterdrückt werden kann. Da aber, wie bereits erwähnt, eine nicht-immunsupprimierte Kontrollgruppe fehlt, können diesbezüglich lediglich Mutmaßungen angestellt werden. Bei einem neugeborenen Jungen, der eine LCT auf Grund eines Ornithin-Transcarbamylase-Mangels 6 Stunden nach seiner Geburt erhielt, wurden transiente niedrige CiclosporinA-Level im Rahmen einer schweren Gastroenteritis beobachtet. Hieraufhin setzte eine

Abstoßungsreaktion gegen die Leberzellen ein und der Junge verstarb wenig später. Die Autoren resümierten daraufhin, dass die LCT eine suffiziente und kontinuierliche Immunsuppression erfordert³⁴.

Calcineurininhibitoren verhindern nicht nur eine Abstoßungsreaktion durch Hemmung der T-Zellen, sondern können auch selbst die Immunogenität des Transplantats beeinflussen. Es gibt Hinweise, dass CiclosporinA die MHC I- und MHC II-Expression von Hepatozyten herabreguliert¹⁰⁸. Somit wäre sein Einsatz bei LCT doppelt gerechtfertigt, da es auch die Integration und Proliferation allogener Hepatozyten verbessern kann¹¹⁴.

5.2.2 MPIO-Markierung

Die *in vitro* Markierung von Leberzellen mit MPIOs ermöglicht die Verfolgung ihres Schicksals nach LCT in der MRT. Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den Einfluss der MPIOs auf immunologische Reaktionen *in vivo* zu beurteilen. Obwohl das Interesse und die Erforschung dieser Methode auf dem Vormarsch sind, gibt es bisher nur wenige Studien, die das Immunogenitätspotential von Eisenoxidpartikeln beleuchten^{49, 115, 116}. Die Rechtfertigung ihrer Unschädlichkeit beruht aktuell auf der allgemeinen Übereinstimmung, dass Eisenoxidpartikel *in vivo* gut toleriert werden⁵³, ohne dass diese Annahme in Bezug auf das Immunsystem durch Studien eindeutig belegt werden kann. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass Eisenoxidpartikel in Nanometergröße (SPIO) Veränderungen von Zellverhalten und Zellmorphologie hervorrufen¹¹⁷. Spekulativ könnte dies auch mit Veränderungen von Oberflächenmolekülen einhergehen, die einen Großteil der Immunogenität von Hepatozyten bestimmen. *Nohroudi* et al. betonen außerdem den schmalen Pfad zwischen zu niedriger Partikelbeladung pro Zelle, die für eine sichere Kontrastgebung in der MRT nicht ausreichend ist und der zu hohen Partikelbelastung, die zu Zellschäden, Apoptose und Nekrose führen kann⁵⁷. Sie beziffern dieses Mittel mit 40 bis 50 MPIOs pro mesenchymaler Stammzelle. Auch *Puppi* et al. zeigten, dass Zellen eine große Menge an Kontrastgebern erhalten müssen, um in der MRT detektiert zu werden⁵³. Unsere Markierungsrate lag bei 20 ± 1 Partikeln pro Zelle. Somit ist es denkbar, dass bei einer größeren Partikelbeladung pro Zelle, wie sie für die klinische Anwendung zur sicheren Detektierbarkeit gebraucht wird, auch andere bzw. vermeintlich stärkere Immunreaktionen möglich sind. Auf der anderen Seite ist zu beachten, dass die Zellaufnahme von Eisenpartikeln die Immunantwort ebenso in Richtung einer Immunsuppression

lenken könnte. Diese Möglichkeit wird durch die Ergebnisse von *Siglianti et al.* unterstrichen ¹¹⁵. Sie fanden heraus, dass die Eisenpartikelaufnahme von Maus- und Rattenmakrophagen *in vitro* das Zytokinprofil derselbigen sowohl basal als auch während der Interaktion mit T-Zellen veränderte: Bei Mäusemakrophagen stieg die Produktion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und in Rattenmakrophagen wurde die TNF α -Produktion als Folge der Eisenaufnahme geblockt ¹¹⁵. Ebenso konnten *Shapiro et al.* keinen negativen Einfluss der MPIO-Leberzellmarkierung auf deren Viabilität, die bei über 95% lag, finden ⁵⁰. In unseren Versuchen hatten wir einen Viabilitätsabfall im Zuge des Isolierungsprozesses zu verzeichnen. Dieser war jedoch nicht der MPIO-Markierung geschuldet, da die Viabilität der nativen Hepatozyten, die nicht eisenmarkiert wurden, ebenfalls nach Kultivierung, Trypsinierung und mechanischer Adhäsionslösung deutlich abfiel. Folglich sollten Isolierungsprotokoll sowie Zellkultur- und Trypsinierungsbedingungen weiterentwickelt werden.

5.2.3 Wirkung der MPIO-Markierung auf immunologische Parameter *in vivo*

Für die zukünftige sichere klinische Anwendbarkeit von eisenmarkierten Hepatozyten bei LCT ist es unverzichtbar, mögliche Auswirkungen auf das und Reaktionen des Rezipientenimmunsystems zu untersuchen. Dafür transplantierten wir MPIO-markierte Hepatozyten über die A. gastroepiploica, das Milzparenchym und die Pfortader in jeweils 3-5 Empfängerschweine pro Applikationsroute. Als Kontrollgruppe diente zum einen die Transplantation nativer Hepatozyten über die genannten Applikationswege mit jeweils 2 Tieren pro Applikationsgruppe sowie die Transplantation von MPIOs über die A. gastroepiploica bei 4 Tieren. Die für eine statistische Auswertung zu geringe Anzahl von Kontrolltieren in der Gruppe der nativen Hepatozytentransplantation und das Fehlen der Kontrollgruppen für die Applikation isolierter MPIO-Partikel über das Milzparenchym und die Pfortader ist durch die Wahl des Großtiermodells zu erklären. Aus logistischen, personellen und ethischen Gründen erschien eine zu Kleintierversuchen äquivalente Anzahl von Versuchstieren dieser Größenordnung nicht möglich. Aus diesem Grund können nachfolgende Veränderungen in der Gruppe der nativen Hepatozytentransplantation nur als Tendenzen beschrieben werden.

Lepore et al. konnten zeigen, dass SPIO-Partikel einen Einstrom von Makrophagen/ Mikrogliazellen im Gegensatz zu unmarkierten neuronalen Vorläuferzellen induzieren

¹¹⁶. Eine Erklärung dafür versuchten sie in der Interaktion von Eisen mit Zytokinen zu finden, da Eisen die Effekte von bestimmten Zytokinen beeinflussen soll und Zytokine eine Inflammationskaskade mit Makrophageneinwanderung einleiten können. Die toxische Konzentration von IFN γ und TNF α war in den Oligodendrozyten, die zusätzlich mit Eisen beladen waren, niedriger. Die Autoren schlossen auf eine eisenvermittelte Zytokintoxizität ¹¹⁸.

In unseren Versuchen zeigte sich eine Immunaktivierung nach Transplantation sowohl von MPIO-markierten als auch von nicht-markierten Hepatozyten, abzulesen an der Zunahme von CD4+MHCII+CD25⁻ - und CD8+MHCII+CD25⁻ T-Zellen, den sogenannten T-Effektorzellen. Die Frequenz von MHC II-exprimierenden T-Zellen steigt mit dem Grad ihrer Aktivierung, folglich dienen sie als gutes Maß zur Beurteilung einer stattgehabten Immunreaktion ¹¹⁹.

Die CD4+MHCII+CD25⁻ T-Zellen zeigten nach Transplantation nativer Hepatozyten am Tag 14 einen deutlicheren Anstieg gegenüber der Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten, wohingegen diese eine stärkere Zunahme der CD8+MHCII+CD25⁻ T-Zellen am Tag 14 im Vergleich zur Kontrollgruppe mit nativen Hepatozyten bewirkte (siehe Abb. 11, 12, 18, 19). Die Eisenmarkierung der Hepatozyten scheint demnach einen unterschiedlichen Effekt auf die Effektorzellen in den CD4⁺ - und CD8⁺ Subpopulationen zu haben. Demgegenüber kam es nach Transplantation isolierter MPIO-Partikel via A. gastroepiploica zu keiner dauerhaften Zunahme der anteiligen CD4+MHCII+CD25⁻ - und CD8+MHCII+CD25⁻ T-Effektorzellen. Bis auf einen signifikanten transienten Anstieg am 2. postoperativen Tag ($p < 0,05$) erreichten die CD4+MHCII+CD25⁻ T-Effektorzellen anschließend wieder ihr Ausgangsniveau (siehe Abb. 18). Der Anteil der CD8+MHCII+CD25⁻ T-Effektorzellen sank sogar im zeitlichen Verlauf (siehe Abb. 19).

Hepatozyten, ob nativ oder markiert, scheinen eine stärkere Immunaktivierung als isolierte MPIOs hervorzurufen, da es zu einem späten deutlichen Anstieg der CD4+MHCII+CD25⁻ - und CD8+MHCII+CD25⁻ T-Zellen gegenüber der Applikation isolierter Eisenpartikel kam. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Kontrolltiere, denen isolierte MPIOs über die A. gastroepiploica appliziert wurden, nur bis um 7. postoperativen Tag untersucht wurden, so dass ein Vergleich am Tag 14 zwischen dieser und den anderen beiden Gruppen (MPIO-markierte Hepatozyten und native Hepatozyten) nicht gezogen werden kann. Hier zeigt sich eine Limitierung unseres Studiendesigns. Insbesondere die Tatsache, dass nach Transplantation von MPIO-

markierten und nativen Hepatozyten der Anteil der CD4+ und CD8+ T-Effektorzellen von Tag 7 auf Tag 14 den größten Sprung nach oben machte, verdeutlicht die Notwendigkeit des Vergleichs zwischen allen 3 Gruppen am Tag 14.

Insgesamt führte die Transplantation isolierter MPIOs zu einem schnellen Anstieg der CD4+ T-Effektorzellen am 2. postoperativen Tag, die am Tag 7 wieder ihr Ausgangsniveau erreichten (siehe Abb. 18). Auf die CD8+ T-Effektorzellen hatten die isolierten Eisenpartikel keinen Einfluss; ihr Anteil sank sogar postoperativ (Abb. 19). Demgegenüber führte die Transplantation eisenmarkierter und nativer Hepatozyten tendenziell zu einem Anstieg der CD4+ - und CD8+ T-Effektorzellen. Das legt die Schlussfolgerung nahe, dass transplantierte isolierte MPIOs nicht immunogen wirken – transplantierte Hepatozyten, egal ob markiert oder nicht markiert, hingegen schon. Dabei scheint die Eisenmarkierung der Hepatozyten vor allem eine Aktivierung der CD8+ T-Effektorzellen gegenüber den nativen Hepatozyten bewirkt zu haben (siehe Abb. 12 und 19).

Der Anteil der CD4+ T-Zellen an der gesamten T-Zellpopulation stieg nach Transplantation MPIO-markierter und nativer Hepatozyten direkt am 2. postoperativen Tag an, um am 14. postoperativen Tag wieder abzufallen (siehe Abb. 9). Analog dazu sank der Anteil CD8+ T-Zellen am 2. postoperativen Tag und stieg am 14. postoperativen Tag wieder an (siehe Abb. 10). Als Vergleich dazu riefen isolierte MPIO-Partikel bei der CD4+ T-Zellsubpopulation einen Abfall und bei der CD8+ T-Zellpopulation eine Zunahme posttransplant hervor (siehe Abb. 16 und 17). Das lässt den Schluss zu, dass Hepatozyten und nicht MPIOs Ursache einer frühen Zunahme der CD4+ T-Zellen sind. Auf der anderen Seite haben scheinbar sowohl Hepatozyten als auch MPIOs einen aktivierenden Einfluss auf die CD8+ T-Zellsubpopulation. Daneben fiel die im Vergleich zum Menschen inverse CD4+/CD8+ Ratio bei den verwendeten Schweinen auf. Diese Ratio weist spezies-spezifische Variationen auf, ist genetisch bedingt individuell sehr unterschiedlich und variiert je nach Gesundheits- bzw. Krankheitszustand des Individuums^{120, 121}.

Im Gegensatz zu nativen Hepatozyten führte die Transplantation MPIO-markierter Leberzellen nach Applikation via A. gastroepiploica zu einem späten Anstieg und nach solcher via Milzparenchym und Pfortader zu einem späten Abfall der MHC II+ Nicht-T-Zellen, also der B-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten (Abb. 13). Die MFI der MHCII+CD3- Zellen zeigte bei Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten im Vergleich zu nativen Hepatozyten am Tag 14 eine Zunahme (Abb. 14).

Somit resultiert v.a. die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten in einer späten Aktivierung und Hochregulierung von MHC II, die bei isolierten MPIOs nicht zu beobachten war (siehe Abb. 21). Bei Transplantation nativer Hepatozyten erreichte die MFI am Tag 14 Werte unterhalb der Ausgangsniveaus (siehe Abb. 14). Allerdings ist bei Messungen von $n = 2$ keine statistische Aussage zu treffen. Es ist demnach denkbar, dass der Transplantation eisenmarkierter Hepatozyten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen auch eine Beteiligung von B-Zellen und Monozyten an der Immunantwort folgt.

Zusammenfassend legen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss nahe, dass die MPIO-Markierung der Hepatozyten eine zum Teil verstärkte Immunantwort des Rezipienten, bezogen auf die CD8+ T-Effektorzellen und die MFI der MHC II+ Nicht-T-Zellen, bewirkt. Unter Berücksichtigung der nicht signifikanten niedrigeren Zellzahl, die in der Gruppe der nativen Hepatozyten transplantiert wurde sowie der geringen Versuchszahl von $n = 2$ kann diesbezüglich jedoch keine eindeutige Bewertung stattfinden. Daneben decken sich unsere Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage über die Problematik der Immunaktivierung nach LCT, da Hepatozyten unabhängig von einer Eisenmarkierung immunogen zu wirken scheinen.

Während naive T-Zellen während der ersten Interaktion mit professionellen APCs aktiviert werden und das MHC-Klasse-II-Molekül auf ihrer Oberfläche exprimieren, können MHCII+ CD4+ T-Zellen selbst als APCs agieren, indem sie Alloantigene aufnehmen, prozessieren und antigenspezifischen T-Zellen präsentieren und diese stimulieren ¹¹⁹. Diese alloreaktiven MHCII+ CD4+ T-Zellen scheinen bei Immunantworten gegen Transplantate eine wichtige Rolle zu spielen ¹¹⁹. Darüber hinaus mündet der CD4+abhängige Weg in der Aktivierung von Makrophagen. Unsere Arbeitsgruppe konnte nach Sektion der Tiere und histologischer Aufarbeitung in portalen Gefäßen, wo transplantierte MPIO-markierte Hepatozyten Mikrothromben gebildet hatten, mittels immunhistologischer Antikörperfärbung eine Infiltration des Thrombus mit Makrophagen nachweisen. Innerhalb des Mikrothrombus konnte mittels Berliner-Blau-Färbung die Anwesenheit der MPIO-Partikel bewiesen werden. Eine positive Reaktion auf das hepatozytenspezifische CK-18-Antigen gelang jedoch nicht. Die Hepatozyten waren demnach nicht mehr intakt bzw. erfolgte ihre Phagozytose durch infiltrierende Makrophagen ⁹⁷. Das angeborene Immunsystem entfernt innerhalb der ersten 24 Stunden mehr als 70% der transplantierten Zellen. In

erster Linie geschieht dies durch Kupffer-Zellen, den ortsansässigen Makrophagen in der Leber ¹²². Die durch Zellemboli verursachte portale Okklusion führt zu einem Perfusions-Reperfusionsschaden, oxidativen Stress und gestörter Zellviabilität, was in der Infiltration von inflammatorischen Zellen mit Zerstörung der transplantierten Hepatozyten mündet ¹¹⁹. Zudem sollen Makrophagen bei der CD4-abhängigen Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion bei LCT eine kritische Rolle spielen ¹²². Die akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion lässt sich trotz des Gebrauchs von Immunsuppressiva nicht unterdrücken und ist mit einem schlechteren Transplantatüberleben als bei T-Zell-vermittelter Immunantwort assoziiert ¹²³. Dieser Mechanismus führt schließlich zur Zerstörung des Transplantats durch rekrutierte bzw. ortsansässige Makrophagen, in der Leber den Kupffer-Zellen. In einem murinen LCT-Modell resultierte die Reduzierung von Makrophagen in CD8-defizienten Mäusen in einem verlängerten Transplantatüberleben ¹²². Über eine Reduktion der residenten hepatischen Kupffer-Zellen könnte die erste Immunantwort des angeborenen Immunsystems eingedämmt werden ¹¹⁴. Eine gestörte Funktion der Kupfferzellen, erzielt durch Vorbehandlung der Tiere mit Gadoliniumchlorid 24 Stunden vor Transplantation, führte zu einem 2-fach verlängerten Überleben der Zellen ¹²⁴. Da Hepatozyten im Vergleich zu Ganzorgantransplantaten kein Endothelium aufweisen, welches die Angriffsfläche für das Empfängerimmunsystem darstellt, eine akute Abstoßung bei LCT dennoch stattfindet, erkennen die Alloantikörper bei Beteiligung der humoralen Immunantwort die Leberzellen vermutlich spezifisch und direkt ¹²². Die Ursache der Makrophageneinwanderung ist am ehesten auf die durch die Mikrothrombenbildung bedingten Gefäßverschlüsse mit konsekutiver Inflammation und Zytokinfreisetzung, die zur Makrophageninfiltration führt, als auf die MPIO-Markierung der Hepatozyten zurückzuführen. Weitere Studien sind folglich nötig, um insbesondere den Aspekt der Makrophagenfunktion bei MPIO-markierter Leberzelltransplantation zu beleuchten.

5.2.4 Unterschiede immunologischer Parameter bezogen auf die Applikationsroute

Die immunologischen Unterschiede bei Leberzelladministration in die Leber im Vergleich zur Milz sind kaum untersucht. Während die Infusion der Hepatozyten bei metabolischen Lebererkrankungen und akuten Leberversagen auf Grund der intakten Leberarchitektur über die Portalvene realisiert wird, dient die Milz bei gestörter Leberinnenstruktur als ektopter Implantationsort, wobei die Hepatozyten in

die Leber translozieren ¹²⁵. Hierbei konnte die direkte intrasplenische Injektion eine bessere Integration der Leberzellen erzielen als die Hepatozytenapplikation über die Milzarterie, da diese durch Hepatozyten okkludiert wurde ¹²⁶. Das gleiche Problem entsteht bei Pfortaderadministration, wenn es in intrahepatischen Gefäßen zur Bildung von Mikrothromben kommt, weil die sinusoidale Barriere von den Hepatozyten nicht überwunden werden konnte ³⁹. Diese Gefäßokklusionen induzieren einen Perfusions-Reperfusionsschaden, oxidativen Stress und eine gestörte Zellviabilität, was wiederum inflammatorische Zellen wie Granulozyten und Makrophagen anlockt, die einen Abstoßungsprozess einleiten ⁸⁵. In unserer Studie konnten sowohl bildgebend über die MRT als auch histologisch korrelierend Mikrothromben mit infiltrierenden Makrophagen im hepatischen Gefäßbett dargestellt werden ⁹⁷. Interessanterweise führte die Applikation von Hepatozyten in die A. gastroepiploica mit Translokation der Zellen in die Leber zu signifikant weniger Mikroembolisationen im Vergleich zur intraportalen Infusion. Demnach ist vorstellbar, dass nicht die Applikationsroute per se für die Initiierung einer Immunantwort entscheidend ist, sondern das Ausmaß der Mikrothrombenbildung.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass sich die geringsten Veränderungen des CD4+ T-Zell-Subpopulationsanteils im zeitlichen Verlauf nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten via A. gastroepiploica sowie nach Transplantation nativer Hepatozyten via Pfortader verzeichnen ließen (siehe Abb. 9). Die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten via Milzparenchym scheint gegenüber den anderen beiden Applikationsrouten die größten Auswirkungen auf die CD4+ und CD8+ T-Zellsubpopulationen gehabt zu haben, da ein früher transplantationsassoziiertes Anstieg der CD4+ Subpopulation mit einem signifikanten Abfall am Tag 14 ($p < 0,05$) bzw. eine signifikante Zunahme der CD8+ Subpopulation am Tag 14 ($p < 0,05$) auffiel (Abb. 16 und 17). In der nativen Hepatozytentransplantationsgruppe ließ sich dieses Verhalten nicht beobachten. Hier persistierte der Anteil der CD4+CD3+ Zellen nach Transplantation über das Milzparenchym auf einem niedrigeren Niveau verglichen mit den Ausgangswerten. Der Anteil der CD8+CD3+ T-Zellen stieg am Tag 14 sowohl bei Transplantation MPIO-markierter als auch bei Transplantation nativer Hepatozyten bis auf die Pfortaderroute über das Ausgangsniveau hinaus an. Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Applikation über die Pfortader z.T. die geringsten Veränderungen an T-Zellsubpopulationsverteilungen verursachte und die

Milzparenchymapplikation von MPIO-markierten Hepatozyten besonders zu einer Zunahme des CD8+ T-Zell-Anteils führte.

Bezüglich der CD4+MHCII+CD25- T-Effektorzellen scheint die Applikation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica und das Milzparenchym eine späte Aktivierung hervorgerufen zu haben, wenn auch nicht statistisch signifikant (siehe Abb. 11). Die Pfortaderroute bewirkte keine Zunahme. Nach Transplantation nativer Hepatozyten kam es zu einem Anstieg des Anteils der CD4+ T-Effektorzellen über alle drei Applikationswege, wobei dieser nach Pfortaderapplikation am geringsten ausfiel.

Bei den CD8+MHCII+CD25- T-Effektorzellen zeigte sich ein ähnliches Bild mit Anstiegen nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über alle drei Applikationsrouten (Abb. 12). Diese Zunahme war bei der A.-gastroepiploica-Route signifikant ($p < 0,05$; siehe Abb. 19) und fiel bei der Pfortaderapplikation am geringsten aus. Eine Zunahme des CD8+ T-Effektorzellanteils stellte sich ebenso nach Transplantation nativer Hepatozyten über die drei Applikationswege ein, jedoch bedeutend geringer (siehe Abb. 12). Auch hier präsentierte die Pfortaderroute die geringsten Zuwächse.

Besonders nach Applikation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica und das Milzparenchym stieg der Anteil der CD4+ und der CD8+ T-Effektorzellen deutlich über das Ausgangsniveau hinaus an. Insgesamt scheint die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über die A. gastroepiploica und das Milzparenchym eine zytotoxische T-Effektorzellantwort hervorgerufen zu haben, die für die hohen Zellverluste nach Transplantation entscheidend sein könnte.

Demgegenüber löste die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten per Milzparenchym und Pfortader einen Abfall der MHC II+ Nicht-T-Zellen am Tag 14 aus, also eine Deaktivierung von Monozyten und B-Zellen (siehe Abb. 13 und 20). Im Gegensatz dazu führten die nativen Hepatozyten zu keinem Verlust der MHC II+ APCs (siehe Abb. 13).

Die MFI der MHC II+ Nicht-T-Zellen machte ein konträres Verhalten im Vergleich zur prozentualen Verteilung in der MPIO-markierten Gruppe deutlich, weil sich eine vermehrte Expression von MHC II nach Milzparenchym- und Pfortaderinjektion am Tag 14 zeigte (siehe Abb. 14 und 21). Nachdem die Applikation via Pfortader zunächst eine postoperative Abnahme der MFI am Tag 2 und Tag 7 hervorrief, die auf Grund eines hohen präoperativen Ausgangswertes signifikant ausfiel ($p < 0,05$),

stellte sich zuletzt ein nicht signifikanter Zuwachs der MFI ein (siehe Abb. 21). Eine Zunahme fiel auch bei der Applikation via Milz auf und war hier am Tag 14 signifikant ($p < 0,05$; siehe Abb. 21). Das konträre Verhalten zwischen prozentualer Verteilung und MFI der MHC II+ Nicht-T-Zellen bei Milzparenchym- und Pfortaderroute könnte sich durch den Verlust von Zellen, die nur wenig MHC II pro Zelle exprimierten und durch den Erhalt von Zellen, die viel MHC II pro Zelle exprimierten, erklären lassen. Bei Transplantation nativer Hepatozyten sank die MFI in allen 3 Applikationsgruppen (siehe Abb. 21). Insgesamt zog die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten über das Milzparenchym und die Pfortader größere Veränderungen der MHC II-tragenden B-Zellen und Monozyten als in den Kontrollgruppen nach sich.

Zusammengefasst deutet sich die Pfortaderroute bezüglich der CD4+ und CD8+ T-Effektorzellen als weniger immunogen an, indes die oben beschriebene Wirkung auf die MHC II+ Nicht-T-Zellen betont werden muss. Hinsichtlich der reduzierten hepatischen Mikrozirkulationsstörung (Mikrothrombenbildung) nach Applikation über die A. gastroepiploica im Vergleich zur intraportalen LCT ließ sich anhand der genannten Erhebungen kein korrelierender Effekt auf die T-Zellsubpopulationen finden.

5.2.5 Veränderungen klinischer Parameter als Ausdruck einer stattgehabten Immunreaktion

Neben den bereits beschriebenen immunologischen Merkmalen einer Immunreaktion ist eine akute Abstoßung ebenfalls an Veränderungen der Lebersynthese- und Leberschädigungsparameter abzulesen. Durch eine Entzündungsreaktion und Drosselung der Blutversorgung verschlechtert sich die Leberfunktion und es kommt zum Anstieg bzw. Abfall bestimmter Leberenzyme im Blut. Leberfunktionstests sind sehr sensitiv, um einen Leberzellschaden im Sinne einer akuten Abstoßungsreaktion herauszufiltern, auch wenn das Ausmaß dieses Mechanismus nicht mit der Höhe der gemessenen Blutparameter korreliert ¹²⁷. Die AST- und ALT-Serumspiegel waren nach LCT, die drei Applikationsrouten betreffend, nicht signifikant unterschiedlich. Der zeitweilige transplantationsassoziierte Anstieg am 2. postoperativen Tag könnte durch intraoperativ bedingte Mikrozirkulationsstörungen sowie direkte Zellschädigung auf Grund der Lebermanipulation bzw. als Folge des Ischämie-Reperfusionsschaden erklärt werden. Außerdem führt die operative Prozedur zu einer Entzündungsreaktion, die wiederum Zellschäden induziert. Der Lebersyntheseparameter Albumin blieb nach LCT konstant, während die

Harnstoffsynthese am 2. postoperativen Tag sogar anstieg, im Verlauf die Ausgangswerte jedoch wieder erreichte. Insgesamt konnte sowohl in der laborchemischen Analyse als auch klinisch kein Anhalt für eine akute Abstoßungsreaktion bei den Tieren nach LCT gefunden werden. Zum einen lässt das den Schluss zu, dass die Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten keinen stärkeren nachteiligen Effekt auf Leberfunktion und –integrität als die Transplantation nicht-markierter Leberzellen hat. Zum anderen kann resümiert werden, dass eine ausreichende Immunsuppression eine Abstoßung der allogenen Hepatozyten verhindert hat.

5.3 Limitierungen

Der in der vorliegenden Dissertation verwendete Versuchsaufbau unterliegt bestimmten Beschränkungen. Im Gegensatz zu anderen Studien, die für die Leberzellmarkierung klinisch zugelassene superparamagnetische Eisenoxidpartikel in Nanometergröße (SPIOs) verwendeten, sahen wir MPIOs als vorteilhafter an: Einerseits besteht bei MPIOs die Möglichkeit, Leberzellen in Suspension zu markieren und andererseits wird eine geringere Beladungszahl von Eisenpartikeln pro Zelle gebraucht, um den nötigen Kontrast zu erreichen. Auch wird durch sie eine bessere Antwort auf klinische Gegebenheiten, was Magnetresonanztomographen und Magnetspulen betrifft, gegeben. Dennoch ist zu beachten, dass die von uns verwendeten MPIOs für den klinischen Gebrauch noch nicht zugelassen sind. Einer der Gründe liegt in der fehlenden biologischen Abbaubarkeit der Partikel ⁵³. Demnach gilt es zu bedenken, dass unsere immunologischen Ergebnisse bei Verwendung anderer, für den klinischen Gebrauch zugelassener Eisenoxidpartikel, verifiziert werden müssen. Des Weiteren ist die Detektierbarkeit der markierten Hepatozyten noch nicht ausreichend sensitiv. Teilen sich Zellen, gelangen die Eisenpartikel auch in die Tochterzellen. Die Konzentration ist jedoch nun zu gering, um ein Signal in der MRT zu erzeugen ⁴⁹. Eine Lösung könnte in der Möglichkeit des Gentransfers von einem Reporter gen, das superparamagnetisches Material produziert, liegen ⁵¹. Ebenso stellen falsch positive Ergebnisse ein Problem dar. Aktuell gelingt es nicht, durch diese Methode lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Die Eisenpartikel verbleiben in apoptotischen Zellen, bis diese v.a. durch Makrophagen abgeräumt werden. Wenn Makrophagen die sterbenden markierten Hepatozyten phagozytieren und sich vom Implantationsort wegbewegen, können sie fälschlicherweise für transplantierte Zellen gehalten werden ⁴⁹. Diese

Limitierung der mangelhaften Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und toten Zellen könnte durch aktive MPIOs behoben werden, die nur ein Signal in vitalen Zellen oder speziellen Zelltypen aussenden, wenn ein bestimmtes Markerenzym exprimiert wird^{51, 128}.

Ein weiterer Limitierungsaspekt lässt sich anhand unseres Studiendesigns festmachen: Wir verwendeten gesunde Versuchstiere mit normaler Architektur der Implantationsorte Leber und Milz. Diese Ausgangslage unterscheidet sich jedoch stark vom klinischen Klientel mit geschädigter Leber bei akutem und chronischem Leberversagen, für das die Leberzelltransplantation einen Heilversuch darstellt. Infolgedessen sind unsere Ergebnisse in Anbetracht eines nicht geschädigten Endotheliums mit größtenteils konsekutivem Verbleib der Zellen im Gefäßbett entsprechend zu werten. Zur Integration ins Leberparenchym und Proliferation der Hepatozyten sind entsprechende Stimuli und Wachstumsvorteile gegenüber den residenten Hepatozyten nötig. Ist diese Voraussetzung gegeben, kann eine über 50%-ige Repopulation auf Grund der enormen Proliferationsfähigkeit von Hepatozyten erzielt werden²⁷. In Tierversuchen konnte bewiesen werden, dass ein Wachstumsvorteil der transplantierten Hepatozyten durch Blockierung der Proliferation von nativen Hepatozyten mittels Monocrotalin oder Retrorsin, beides Alkaloide, einen annähernd kompletten Leberaustausch bewirkte²⁷. Die partielle Embolisation der Pfortader, die Bestrahlung sowie die Teilresektion der Leber könnten die benötigten Stimuli liefern¹⁰⁶. Eine zeitweilige Embolisation der Pfortader mit einem absorbierbaren Material führt zu einem Ischämie-Reperfusionsschaden, der wiederum die Integration der Hepatozyten durch Aufhebung der sinusoidalen endothelialen Barriere ermöglicht¹²⁹. In gleicher Weise wirkt die Bestrahlung der Leber. Diese induziert eine Apoptose der hepatischen sinusoidalen endothelialen Zellen und unterdrückt die phagozytierende Funktion der Kupffer-Zellen²⁸. Bereits eine einmalige 10 Gy Bestrahlungsdosis verbesserte die Integration von transplantierten porcinen Hepatozyten ins Leberparenchym von Makaken¹³⁰. Zuletzt induziert die Leberteilresektion einen starken Proliferationsstimulus und wird bei Tierversuchen oft zur Steigerung der Anwachsrate von transplantierten Hepatozyten benutzt¹³¹. Insgesamt werden diese destruirenden Techniken kaum den Sprung in den Klinikalltag schaffen, da die Anwendung insbesondere bei Kindern, die eine LCT auf Grund eines metabolischen Defekts erhalten, kritisch zu betrachten ist und beispielsweise hepatotoxische Effekte bei Bestrahlung unbedingt zu vermeiden sind

¹⁰⁶. Daher müssen nicht-invasive Methoden zur Verbesserung von Integration und Proliferation der transplantierten Hepatozyten weiter untersucht werden.

5.4 Ausblick

Die Leberzelltransplantation und neuartige Methoden zur Detektierbarkeit der Zellen nach Transplantation werden weiterhin erforscht. Weltweit erhielten bisher an die 100 Patienten eine LCT ¹⁰⁶. Hauptgründe waren angeborene Harnstoffzyklusdefekte und akutes Leberversagen unterschiedlichster Ätiologie. Das Problem der eingeschränkten Organverfügbarkeit trifft jedoch nicht nur auf Ganzorgantransplantate, sondern ebenso auf Hepatozyten zu. Daher werden momentan andere Quellen hepatozytenähnlicher Zellen untersucht ¹⁰⁶. So konnte bereits demonstriert werden, dass sowohl aus erwachsenen als auch aus fetalen Lebern isolierte Progenitor-/Stammzellen das Potential haben, in funktionelle Hepatozyten zu differenzieren ¹³². Ebenso wird das Potential von immortalisierten Hepatozyten ¹³³, embryonalen Stammzellen, induzierten pluripotenten Stammzellen und der Xenotransplantation zur Begegnung des Organmangels beleuchtet ²⁷. Autologe Zellen, beispielsweise aus dem Knochenmark, würden eine Immunsuppression unnötig machen ⁶. Darüber hinaus müssen die bereits zur Verfügung stehenden Hepatozytenquellen optimaler genutzt werden. Dies sind Teillebersegmente, die für eine Transplantation nicht genutzt werden, Lebern von Spendern mit Herzstillstand und neonatale Spenderlebern, die für eine Ganzorganspende zu klein sind, jedoch eine ausreichende Anzahl an qualitativ hochwertigen Leberzellen liefern ²⁷. Die Überwindung des Empfängerimmunsystems als Gegner einer erfolgreichen LCT begründet weitere Anstrengungen auf diesem Gebiet. Einkapselte porcine Hepatozyten bewirkten nach Transplantation in einem Mausmodell für fulminantes Leberversagen ein verlängertes Überleben ¹³⁴. Die Viabilität und Funktion von Hepatozyten, eingekapselt in einer semipermeablen Membran und ins Cavum peritoneale von Ratten transplantiert, konnte bis zu 90 Tage ohne Immunsuppression erhalten werden ¹³⁵. Da die Zellen in den Mikrokapseln nun mehr vom Immunsystem unentdeckt bleiben, kann eine Immunsuppression vermieden werden ¹⁰⁶. Die Co-Transplantation von Hepatozyten mit immunmodulatorischen Knochenmarkszellen verbesserte die Funktion und Viabilität von Hepatozyten bei *in vitro* und *in vivo* Versuchen ¹³⁶. Dass eine reduzierte Immunogenität für ein verlängertes Überleben von transplantierten Leberzellen bei fehlender Immunsuppression verantwortlich sein kann, zeigen die Ergebnisse von

Ostrowska et al. ¹³⁷. Während die Transplantation nicht modifizierter Hepatozyten eine akute Abstoßungsreaktion mit Infiltration von mononukleären Zellen nach sich zog, war dies bei Transplantation gereinigter bzw. kryokonservierter Hepatozyten bis zu 21 Tage nach Transplantation nicht der Fall. Die Unterdrückung der angeborenen Immunantwort, die sich durch Aktivierung der Komplementkaskade und Leukozyteninfiltration äußert, gelang bei *in vitro* Versuchen durch N-Acetylcystein und Dextransulfat ²⁷. Ebenso hat UV-B-Bestrahlung positive Effekte, da sie die Zelloberflächeneigenschaften verändert und die Immunogenität von Hepatozyten reduziert ⁹. Ein weiterer Grund, die Forschungsbemühungen bezüglich der Umgehung des Empfängerimmunsystems voranzutreiben, ist die Erkenntnis, dass Immunsuppressiva, insbesondere solche, die über die Inhibition von mTOR wie Sirolimus wirken, die Zellproliferation negativ beeinflussen können ¹¹⁴. Wenn eine Immuntoleranz von Hepatozyten zukünftig erreicht werden könnte, hätte die LCT einen eindeutigen Vorteil gegenüber der OLT und könnte ihr möglicherweise den Goldstandardrang bei Therapie transplantationspflichtiger Lebererkrankungen ablaufen.

6. Literaturverzeichnis

- ¹ Tucholsky K, "Der Mensch", in: *Die Weltbühne*, 16. Juni 1931, S. 889 f.
- ² Klinker R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, *Physiologie*, 6th ed. (Stuttgart: Thieme, 2009).
- ³ Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, Schade RR, Shaw BW Jr, Hakala TR, Rosenthal JT, Porter KA, "Evolution of Liver Transplantation," *Hepatology (Baltimore, Md.)* 2, no. 5 (October 1982): 614–636.
- ⁴ Calne RY, Rolles K, White DJ, Thiru S, Evans DB, McMaster P, Dunn DC, Craddock GN, Henderson RG, Aziz S, Lewis P, "Cyclosporin A Initially as the Only Immunosuppressant in 34 Recipients of Cadaveric Organs: 32 Kidneys, 2 Pancreases, and 2 Livers," *Lancet* 2, no. 8151 (November 17, 1979): 1033–1036.
- ⁵ Puppi J, Dhawan A, "Human Hepatocyte Transplantation Overview," *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 481 (2009): 1–16.
- ⁶ Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A, "Human Hepatocyte Transplantation: State of the Art," *Journal of Internal Medicine* 266, no. 4 (October 2009): 339–357.
- ⁷ Adam R, Karam V, Delvart V, O'Grady J, Mirza D, Klempnauer J, Castaing D, Neuhaus P, Jamieson N, Salizzoni M, Pollard S, Lerut J, Paul A, Garcia-Valdecasas JC, Rodríguez FS, Burroughs A, "Evolution of Indications and Results of Liver Transplantation in Europe. A Report from the European Liver Transplant Registry (ELTR)," *Journal of Hepatology* 57, no. 3 (September 2012): 675–688.
- ⁸ Vogt DP, Henderson JM, Carey WD, Barnes D, "The Long-term Survival and Causes of Death in Patients Who Survive at Least 1 Year After Liver Transplantation," *Surgery* 132, no. 4 (October 2002): 775–780.
- ⁹ Gewartowska M, Olszewski WL, "Hepatocyte transplantation-biology and application," *Annals of Transplantation: Quarterly of the Polish Transplantation Society* 12, no. 1 (2007): 27–36.
- ¹⁰ Berry MN, Friend DS, "High-yield Preparation of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells: a Biochemical and Fine Structural Study," *The Journal of Cell Biology* 43, no. 3 (December 1969): 506–520.
- ¹¹ Seglen PO, "Preparation of Rat Liver Cells. 3. Enzymatic Requirements for Tissue Dispersion," *Experimental Cell Research* 82, no. 2 (December 1973): 391–398.
- ¹² Matas AJ, Sutherland DER, Steffes MW, Mauer SM, Lowe A, Simmons RL, Najarian JS, "Hepatocellular Transplantation for Metabolic Deficiencies: Decrease of Plasma Bilirubin in Gunn Rats," *Science (New York, N.Y.)* 192, no. 4242 (May 28, 1976): 892–894.
- ¹³ Mito M, Ebata H, Kusano M, Onishi T, Hiratsuka M, Saito T., "Studies on Ectopic Liver Utilizing Hepatocyte Transplantation into the Rat Spleen," *Transplantation Proceedings* 11, no. 1 (March 1979): 585–591.
- ¹⁴ Yoshida Y, Tokusashi Y, Lee GH, Ogawa K, "Intrahepatic Transplantation of Normal Hepatocytes Prevents Wilson's Disease in Long-Evans Cinnamon Rats," *Gastroenterology* 111, no. 6 (December 1996): 1654–1660.
- ¹⁵ Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M, "Serial Transplantation Reveals the Stem-cell-like Regenerative Potential of Adult Mouse Hepatocytes," *The American Journal of Pathology* 151, no. 5 (November 1997): 1273–1280.
- ¹⁶ Wiederkehr JC, Kondos GT, Pollak R, "Hepatocyte Transplantation for the Low-density Lipoprotein Receptor-deficient State. A Study in the Watanabe Rabbit," *Transplantation* 50, no. 3 (September 1990): 466–471.

-
- ¹⁷ Minato M, Houssin D, Demma I, Morin J, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H, "Transplantation of Hepatocytes for Treatment of Surgically Induced Acute Hepatic Failure in the Rat," *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes* 16, no. 3 (1984): 162–169.
- ¹⁸ Takeshita K, Ishibashi H, Suzuki M, Kodama M, "Hepatocellular Transplantation for Metabolic Support in Experimental Acute Ischemic Liver Failure in Rats", *Cell Transplantation* 2, no. 4 (August 1993): 319–324.
- ¹⁹ Mito M, Kusano M, Kawaura Y, "Hepatocyte Transplantation in Man," *Transplantation Proceedings* 24, no. 6 (December 1992): 3052–3053.
- ²⁰ Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC, "Treatment of the Crigler–Najjar Syndrome Type I with Hepatocyte Transplantation," *New England Journal of Medicine* 338, no. 20 (May 14, 1998): 1422–1427.
- ²¹ Fisher RA, Strom SC, "Human hepatocyte transplantation: worldwide results," *Transplantation* 82, no. 4 (August 27, 2006): 441–449.
- ²² Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J, "Hepatocyte Transplantation in Acute Liver Failure", *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 6, no. 1 (January 2000): 32–40.
- ²³ Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ, "Hepatocyte Transplantation for the Treatment of Human Disease," *Seminars in Liver Disease* 19, no. 1 (1999): 39–48.
- ²⁴ Bachir NM, Larson AM, "Adult Liver Transplantation in the United States", *The American Journal of the Medical Sciences* 343, no. 6 (June 2012): 462–469.
- ²⁵ Richter-Kuhlmann E, "Organspenderate bleibt 2013 niedrig", *Deutsches Ärzteblatt* (2013), no. 47 (n.d.): 1983.
- ²⁶ Deutsche Stiftung Organtransplantation, *Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland* 2016: 48.
- ²⁷ Jorns C, Ellis EC, Nowak G, Fischler B, Nemeth A, Strom SC, Ericzon BG, "Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver", *Journal of Internal Medicine* 272, no. 3 (September 2012): 201–223.
- ²⁸ Soltys KA, Soto-Gutiérrez A, Nagaya M, Baskin KM, Deutsch M, Ryotaro I, Shneider BL, Squires R, Vockley J, Guha C, Roy-Chowdhury J, Strom JC, Platt JL, Fox IJ, "Barriers to the successful treatment of liver disease by hepatocyte transplantation," *Journal of Hepatology* 53, no. 4 (October 2010): 769–774.
- ²⁹ Dhawan A, Strom S, Sokal EM, Fox IJ, "Human Hepatocyte Transplantation", *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 640 (2010): 525–534.
- ³⁰ Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, "Hepatocyte Transplantation for Liver-based Metabolic Disorders", *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29, no. 2–3 (June 2006): 431–435.
- ³¹ Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, Stein EA, Lupien PJ, Brewer HB Jr, Raper SE, "A Pilot Study of Ex Vivo Gene Therapy for Homozygous Familial Hypercholesterolaemia", *Nature Medicine* 1, no. 11 (November 1995): 1148–1154.
- ³² Horslen SP, Fox IJ, "Hepatocyte Transplantation," *Transplantation* 77, no. 10 (May 27, 2004): 1481–1486.
- ³³ Mukherjee S, Mukherjee U, "A comprehensive review of immunosuppression used for liver transplantation", *Journal of Transplantation* 2009 (2009): 701464.
- ³⁴ Meyburg J, Das AM, Hoerster F, Lindner M, Kriegbaum H, Engelmann G, Schmidt J, Ott M, Pettenazzo A, Luecke T, Bertram H, Hoffmann GF, Burlina A., "One liver for

four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects”, *Transplantation* 87, no. 5 (March 15, 2009): 636–641.

³⁵ Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, Rela M, “One Liver, Three Recipients: Segment IV from Split-liver Procedures as a Source of Hepatocytes for Cell Transplantation”, *Transplantation* 77, no. 10 (May 27, 2004): 1614–1616.

³⁶ Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gómez-Lechón MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A., “Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London”, *Cell Transplantation* 21, no. 1 (2012): 1–10.

³⁷ Khan AA, Habeeb A, Parveen N, Naseem B, Babu RP, Capoor AK, “Peritoneal Transplantation of Human Fetal Hepatocytes for the Treatment of Acute Fatty Liver of Pregnancy: a Case Report”, *Tropical Gastroenterology: Official Journal of the Digestive Diseases Foundation* 25, no. 3 (September 2004): 141–143.

³⁸ Papalois A, Arkadopoulos N, Pataryas TH, Papadimitriou J, Golematis B, “Combined Hepatocyte-islet Transplantation: An Allograft Model”, *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* 7 Suppl 1 (1994): S432–435.

³⁹ Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM, “Entry and Integration of Transplanted Hepatocytes in Rat Liver Plates Occur by Disruption of Hepatic Sinusoidal Endothelium”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 29, no. 2 (February 1999): 509–519.

⁴⁰ Allen KJ, Soriano HE, “Liver Cell Transplantation: The Road to Clinical Application”, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 138, no. 5 (November 2001): 298–312.

⁴¹ Mas VR, Maluf D, Thompson MT, Fisher RA, “Engraftment measurement in human liver tissue after liver cell transplantation by short tandem repeats analysis”, *Cell Transplantation* 13, no. 3 (2004): 231–236.

⁴² Stéphenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne M-C, Smets F, Sokal EM, “Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency”, *Gastroenterology* 130, no. 4 (April 2006): 1317–1323.

⁴³ Wang LJ, Chen YM, George D, Smets F, Sokal EM, Bremer EG, Soriano HE, “Engraftment assessment in human and mouse liver tissue after sex-mismatched liver cell transplantation by real-time quantitative PCR for Y chromosome sequences”, *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 8, no. 9 (September 2002): 822–828.

⁴⁴ Bohnen NI, Charron M, Reyes J, Rubinstein W, Strom SC, Swanson D, Towbin R, “Use of Indium-111-labeled Hepatocytes to Determine the Biodistribution of Transplanted Hepatocytes Through Portal Vein Infusion”, *Clinical Nuclear Medicine* 25, no. 6 (June 2000): 447–450.

⁴⁵ Gupta S, Vasa SR, Rajvanshi P, Zuckier LS, Palestro CJ, Bhargava KK “Analysis of Hepatocyte Distribution and Survival in Vascular Beds with Cells Marked by ^{99m}Tc or Endogenous Dipeptidyl Peptidase IV Activity”, *Cell Transplantation* 6, no. 4 (August 1997): 377–386.

⁴⁶ Rogers WJ, Meyer CH, Kramer CM, “Technology insight: in vivo cell tracking by use of MRI”, *Nature Clinical Practice. Cardiovascular Medicine* 3, no. 10 (October 2006): 554–562.

-
- ⁴⁷ Modo M, “Noninvasive imaging of transplanted cells”, *Current Opinion in Organ Transplantation* 13, no. 6 (December 2008): 654–658.
- ⁴⁸ Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A Jr., “Magnetically Labeled Cells Can Be Detected by MR Imaging”, *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 7, no. 1 (February 1997): 258–263.
- ⁴⁹ Bulte JWM, “In Vivo MRI Cell Tracking: Clinical Studies”, *AJR. American Journal of Roentgenology* 193, no. 2 (August 2009): 314–325.
- ⁵⁰ Shapiro EM, Sharer K, Skrtic S, Koretsky AP, “In Vivo Detection of Single Cells by MRI”, *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 55, no. 2 (February 2006): 242–249.
- ⁵¹ Slotkin JR, Cahill KS, Tharin SA, Shapiro EM, “Cellular Magnetic Resonance Imaging: Nanometer and Micrometer Size Particles for Noninvasive Cell Localization”, *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 4, no. 3 (July 2007): 428–433.
- ⁵² Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, Vondran FWR, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM, “Imaging of Primary Human Hepatocytes Performed with Micron-sized Iron Oxide Particles and Clinical Magnetic Resonance Tomography”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12, no. 4 (August 2008): 1384–1394.
- ⁵³ Puppi J, Mityr RR, Modo M, Dhawan A, Raja K, Hughes RD, “Use of a Clinically Approved Iron Oxide MRI Contrast Agent to Label Human Hepatocytes”, *Cell Transplantation* 20, no. 6 (2011): 963–975.
- ⁵⁴ Modo M, Hoehn M, Bulte JWM, “Cellular MR Imaging”, *Molecular Imaging* 4, no. 3 (September 2005): 143–164.
- ⁵⁵ de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Barentsz JO, Verdijk P, van Krieken JH, Boerman OC, Oyen WJ, Bonenkamp JJ, Boezeman JB, Adema GJ, Bulte JW, Scheenen TW, Punt CJ, Heerschap A, Figdor CG, “Magnetic Resonance Tracking of Dendritic Cells in Melanoma Patients for Monitoring of Cellular Therapy”, *Nature Biotechnology* 23, no. 11 (November 2005): 1407–1413.
- ⁵⁶ Toso C, Vallee JP, Morel P, Ris F, Demuylder-Mischler S, Lepetit-Coiffe M, Marangon N, Saudek F, James Shapiro AM, Bosco D, Berney T, “Clinical Magnetic Resonance Imaging of Pancreatic Islet Grafts After Iron Nanoparticle Labeling”, *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 8, no. 3 (March 2008): 701–706.
- ⁵⁷ Nohroudi K, Arnhold S, Berhorn T, Addicks K, Hoehn M, Himmelreich U, “In Vivo MRI Stem Cell Tracking Requires Balancing of Detection Limit and Cell Viability”, *Cell Transplantation* 19, no. 4 (2010): 431–441.
- ⁵⁸ Shapiro EM, Skrtic S, Koretsky AP, “Sizing It up: Cellular MRI Using Micron-sized Iron Oxide Particles”, *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 53, no. 2 (February 2005): 329–338.
- ⁵⁹ Arakelov A, Lakkis FG, “The Alloimmune Response and Effector Mechanisms of Allograft Rejection”, *Seminars in Nephrology* 20, no. 2 (March 2000): 95–102.
- ⁶⁰ Krogsgaard M, Davis MM, “How T Cells ‘See’ Antigen”, *Nature Immunology* 6, no. 3 (March 2005): 239–245.
- ⁶¹ “Complete Sequence and Gene Map of a Human Major Histocompatibility Complex. The MHC Sequencing Consortium”, *Nature* 401, no. 6756 (October 28, 1999): 921–923.

-
- ⁶² Erie AJ, Samsel L, Takaku T, Desierto MJ, Keyvanfar K, McCoy JP, Young NS, Chen J, “MHC Class II Upregulation and Colocalization with Fas in Experimental Models of Immune-mediated Bone Marrow Failure”, *Experimental Hematology* 39, no. 8 (August 2011): 837–849.
- ⁶³ Speeti M, Ståhls A, Meri S, Westermarck E, “Upregulation of Major Histocompatibility Complex Class II Antigens in Hepatocytes in Doberman Hepatitis”, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 96, no. 1–2 (November 15, 2003): 1–12.
- ⁶⁴ Opelz G, “Factors Influencing Long-term Graft Loss. The Collaborative Transplant Study”, *Transplantation Proceedings* 32, no. 3 (May 2000): 647–649.
- ⁶⁵ Sheldon S, Poulton K, “HLA typing and its influence on organ transplantation”, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 333 (2006): 157–174.
- ⁶⁶ Muro M, López-Álvarez MR, Campillo JA, Marin L, Moya-Quiles MR, Bolarín JM, Botella C, Salgado G, Martínez P, Sánchez-Bueno F, López-Hernández R, Boix F, Bosch A, Martínez H, de la Peña-Moral JM, Pérez N, Robles R, García-Alonso AM, Minguela A, Miras M, Alvarez-López MR, “Influence of Human Leukocyte Antigen Mismatching on Rejection Development and Allograft Survival in Liver Transplantation: Is the Relevance of HLA-A Locus Matching Being Underestimated?”, *Transplant Immunology* 26, no. 2–3 (March 2012): 88–93.
- ⁶⁷ Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y, “Ligand Recognition by Alpha Beta T Cell Receptors”, *Annual Review of Immunology* 16 (1998): 523–544.
- ⁶⁸ Zamoyska R, “CD4 and CD8: Modulators of T-cell Receptor Recognition of Antigen and of Immune Responses?”, *Current Opinion in Immunology* 10, no. 1 (February 1998): 82–87.
- ⁶⁹ Janeway Jr CA, “The T Cell Receptor as a Multicomponent Signalling Machine: CD4/CD8 Coreceptors and CD45 in T Cell Activation”, *Annual Review of Immunology* 10 (1992): 645–674.
- ⁷⁰ Wang J-h, Reinherz EL, “Structural Basis of T Cell Recognition of Peptides Bound to MHC Molecules”, *Molecular Immunology* 38, no. 14 (May 2002): 1039–1049.
- ⁷¹ Sundstrom JB, Ansari AA, “Comparative Study of the Role of Professional Versus Semiprofessional or Nonprofessional Antigen Presenting Cells in the Rejection of Vascularized Organ Allografts”, *Transplant Immunology* 3, no. 4 (December 1995): 273–289.
- ⁷² Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE, “Donor Major Histocompatibility Complex (MHC) Peptides Are Presented by Recipient MHC Molecules During Graft Rejection”, *The Journal of Experimental Medicine* 175, no. 1 (January 1, 1992): 305–308.
- ⁷³ Gonzalo JA, Delaney T, Corcoran J, Goodearl A, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, “Cutting Edge: The Related Molecules CD28 and Inducible Costimulator Deliver Both Unique and Complementary Signals Required for Optimal T Cell Activation”, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 166, no. 1 (January 1, 2001): 1–5.
- ⁷⁴ Bour-Jordan H, Blueston JA, “CD28 Function: a Balance of Costimulatory and Regulatory Signals”, *Journal of Clinical Immunology* 22, no. 1 (January 2002): 1–7.
- ⁷⁵ Gaffen SL, “Signaling Domains of the Interleukin 2 Receptor”, *Cytokine* 14, no. 2 (April 21, 2001): 63–77.
- ⁷⁶ Barry M, Bleackley RC, “Cytotoxic T Lymphocytes: All Roads Lead to Death”, *Nature Reviews. Immunology* 2, no. 6 (June 2002): 401–409.
- ⁷⁷ Zimmermann KC, Green DR, “How Cells Die: Apoptosis Pathways”, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 108, no. 4 Suppl (October 2001): S99–103.

-
- ⁷⁸ Stout RD, Bottomly K, “Antigen-specific Activation of Effector Macrophages by IFN-gamma Producing (TH1) T Cell Clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T Cell Clones to Activate Effector Function in Macrophages”, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 142, no. 3 (February 1, 1989): 760–765.
- ⁷⁹ Duffield JS, “The Inflammatory Macrophage: a Story of Jekyll and Hyde”, *Clinical Science (London, England: 1979)* 104, no. 1 (January 2003): 27–38.
- ⁸⁰ McHeyzer-Williams LJ, Malherbe LP, McHeyzer-Williams MG, “Helper T Cell-regulated B Cell Immunity”, *Current Topics in Microbiology and Immunology* 311 (2006): 59–83.
- ⁸¹ Evans DE, Munks MW, Purkerson JM, Parker DC, “Resting B Lymphocytes as APC for Naive T Lymphocytes: Dependence on CD40 ligand/CD40”, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 164, no. 2 (January 15, 2000): 688–697.
- ⁸² Inal A, “Immunology of liver transplantation”, *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* 12 Suppl 1 (March 2014): 5–10.
- ⁸³ Benseler V, McCaughan GW, Schlitt HJ, Bishop GA, Bowen DG, Bertolino P, “The Liver: a Special Case in Transplantation Tolerance”, *Seminars in Liver Disease* 27, no. 2 (May 2007): 194–213.
- ⁸⁴ Bertolino P, Trescol-Biémont MC, Rabourdin-Combe C, “Hepatocytes Induce Functional Activation of Naive CD8+ T Lymphocytes but Fail to Promote Survival”, *European Journal of Immunology* 28, no. 1 (January 1998): 221–236.
- ⁸⁵ Han B, Lu Y, Meng B, Qu B, “Cellular Loss After Allogenic Hepatocyte Transplantation”, *Transplantation* 87, no. 1 (January 15, 2009): 1–5.
- ⁸⁶ Bumgardner GL, Orosz CG, “Unusual Patterns of Alloimmunity Evoked by Allogeneic Liver Parenchymal Cells”, *Immunological Reviews* 174 (April 2000): 260–279.
- ⁸⁷ Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W, “Cell-mediated Rejection Results in Allograft Loss After Liver Cell Transplantation”, *Liver Transplantation: Official Publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 14, no. 5 (May 2008): 688–694.
- ⁸⁸ Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV, “Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-free Immunosuppressive Regimen”, *The New England Journal of Medicine* 343, no. 4 (July 27, 2000): 230–238.
- ⁸⁹ Gao W, Demirci G, Li XC, “Negative T Cell Costimulation and Islet Tolerance”, *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 19, no. 3 (June 2003): 179–185.
- ⁹⁰ Gao D, Li J, Orosz CG, Bumgardner GL, “Different Costimulation Signals Used by CD4(+) and CD8(+) Cells That Independently Initiate Rejection of Allogenic Hepatocytes in Mice”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 32, no. 5 (November 2000): 1018–1028.
- ⁹¹ Bumgardner GL, Li J, Apte S, Heining M, Frankel WL, “Effect of Tumor Necrosis Factor Alpha and Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression on Immunogenicity of Murine Liver Cells in Mice”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 28, no. 2 (August 1998): 466–474.
- ⁹² Lunsford KE, Horne PH, Koester MA, Eiring AM, Walker JP, Dziema HL, Bumgardner GL, “Activation and Maturation of Alloreactive CD4-independent, CD8 Cytolytic T Cells”, *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 6, no. 10 (October 2006): 2268–2281.

-
- ⁹³ Bumgardner GL, Gao D, Li J, Baskin JH, Heininger M, Orosz CG, "Rejection Responses to Allogeneic Hepatocytes by Reconstituted SCID Mice, CD4, KO, and CD8 KO Mice", *Transplantation* 70, no. 12 (December 27, 2000): 1771–1780.
- ⁹⁴ Horne PH, Lunsford KE, Eiring AM, Wang Y, Gao D, Bumgardner GL, "CD4+ T-cell-dependent Immune Damage of Liver Parenchymal Cells Is Mediated by Alloantibody", *Transplantation* 80, no. 4 (August 27, 2005): 514–521.
- ⁹⁵ Wesolowska A, Olszewski WL, Durlik M, "Transplantation of Hepatocytes: Elimination of Recipient Natural Killer Cells with Irradiation and Bone Marrow Reconstitution Prevent Early Graft Dysfunction", *Transplantation Proceedings* 35, no. 6 (September 2003): 2358–2360.
- ⁹⁶ Olszewski WL, Hiwot H, Interewicz B, Rudowska A, Szyper E, Mecner B, "Hepatocyte Transplantation--in Vitro Cytotoxic Reaction of Autologous Granulocytes and Mononuclears to Isolated Hepatocytes", *Annals of Transplantation: Quarterly of the Polish Transplantation Society* 4, no. 3–4 (1999): 11–16.
- ⁹⁷ Steinz K, „Evaluation der Applikationsrouten für die Leberzelltransplantation im Großtiermodell“, *Medizinische Bibliothek der Charité-Universitätsmedizin Berlin* (2012).
- ⁹⁸ van de Kerkhove MP, Poyck PP, van Wijk AC, Galavotti D, Hoekstra R, van Gulik TM, Chamuleau RA, "Assessment and Improvement of Liver Specific Function of the AMC-bioartificial Liver", *The International Journal of Artificial Organs* 28, no. 6 (June 2005): 617–630.
- ⁹⁹ Dehoux J-P, Gianello P, "The Importance of Large Animal Models in Transplantation", *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12 (2007): 4864–4880.
- ¹⁰⁰ Clemmings SM, Alan TJ, Bumgardner GL, Ascher NL, "Lack of Class II Antigen Expression on Hepatocytes Profoundly Affects CTL Development in Vitro and in Vivo", *Transplantation Proceedings* 23, no. 1 Pt 1 (February 1991): 817–818.
- ¹⁰¹ Bumgardner GL, Chen S, Hoffman R, Cahill DC, So SK, Platt J, Bach FH, Ascher NL, "Afferent and Efferent Pathways in T Cell Responses to MHC Class I+, II-hepatocytes", *Transplantation* 47, no. 1 (January 1989): 163–170.
- ¹⁰² Bumgardner GL, Li J, Heininger M, Ferguson RM, Orosz CG, "In Vivo Immunogenicity of Purified Allogeneic Hepatocytes in a Murine Hepatocyte Transplant Model", *Transplantation* 65, no. 1 (January 15, 1998): 47–52.
- ¹⁰³ Bailey M, Christoforidou Z, Lewis MC, "The Evolutionary Basis for Differences Between the Immune Systems of Man, Mouse, Pig and Ruminants", *Veterinary Immunology and Immunopathology* (September 26, 2012).
- ¹⁰⁴ Kirk AD, "Crossing the Bridge: Large Animal Models in Translational Transplantation Research", *Immunological Reviews* 196 (December 2003): 176–196.
- ¹⁰⁵ Summerfield A, Rziha HJ, Saalmüller A, "Functional characterization of porcine CD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes", *Cellular Immunology* 168, no. 2 (March 15, 1996): 291–296.
- ¹⁰⁶ Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, "Current Status of Hepatocyte Transplantation", *Transplantation* 93, no. 4 (February 27, 2012): 342–347.
- ¹⁰⁷ Bumgardner GL, Chen S, Almond PS, Bach FH, Ascher NL, Matas AJ, "Cell Subsets Responding to Purified Hepatocytes and Evidence of Indirect Recognition of Hepatocyte Major Histocompatibility Complex Class I Antigen. II. In Vitro-generated 'Memory' Cells to Class I+ Class II- Hepatocytes", *Transplantation* 53, no. 4 (April 1992): 863–868.
- ¹⁰⁸ Fouzas I, Daoudaki M, Sotiropoulos GC, Vrochides D, Papanikolaou V, Imvrios G, Sgourakis G, Molmenti EP, Vavatsi N, Thalhammer T, Takoudas D, Broelsch CE,

-
- “Cyclosporine Enhances Liver Regeneration: The Role of Hepatocyte MHC Expression and PGE2--a Study Relevant to Graft Immunogenicity”, *European Journal of Medical Research* 13, no. 4 (April 30, 2008): 154–162.
- ¹⁰⁹ Arvieux C, Calmus Y, Gane P, Legendre C, Mariani P, Delelo R, Poupon R, Nordlinger B, “Immunogenicity of Rat Hepatocytes in Vivo: Effect of Cholestasis-induced Changes in Major Histocompatibility Complex Expression”, *Journal of Hepatology* 18, no. 3 (July 1993): 335–341.
- ¹¹⁰ Spengler U, Pape GR, Hoffmann RM, Johnson JP, Eisenburg J, Paumgartner G, Riethmüller G, “Differential Expression of MHC Class II Subregion Products on Bile Duct Epithelial Cells and Hepatocytes in Patients with Primary Biliary Cirrhosis”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 8, no. 3 (June 1988): 459–462.
- ¹¹¹ Steinhoff G, “Major Histocompatibility Complex Antigens in Human Liver Transplants”, *Journal of Hepatology* 11, no. 1 (July 1990): 9–15.
- ¹¹² Frey BM, Sieber M, Mettler D, Gänger H, Frey FJ, “Marked Interspecies Differences Between Humans and Pigs in Cyclosporine and Prednisolone Disposition”, *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 16, no. 2 (April 1988): 285–289.
- ¹¹³ Rosengard BR, Ojikutu CA, Guzzetta PC, Smith CV, Sundt TM 3rd, Nakajima K, Boorstein SM, Hill GS, Fishbein JM, Sachs DH, “Induction of Specific Tolerance to Class I-disparate Renal Allografts in Miniature Swine with Cyclosporine”, *Transplantation* 54, no. 3 (September 1992): 490–497.
- ¹¹⁴ Wu Y-M, Joseph B, Gupta S, “Immunosuppression using the mTOR inhibition mechanism affects replacement of rat liver with transplanted cells”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 44, no. 2 (August 2006): 410–419.
- ¹¹⁵ Siglienti I, Bendszus M, Kleinschnitz C, Stoll G, “Cytokine Profile of Iron-laden Macrophages: Implications for Cellular Magnetic Resonance Imaging”, *Journal of Neuroimmunology* 173, no. 1–2 (April 2006): 166–173.
- ¹¹⁶ Lepore AC, Walczak P, Rao MS, Fischer I, Bulte JW, “MR Imaging of Lineage-restricted Neural Precursors Following Transplantation into the Adult Spinal Cord”, *Experimental Neurology* 201, no. 1 (September 2006): 49–59.
- ¹¹⁷ Berry CC, Wells S, Charles S, Aitchison G, Curtis AS, “Cell Response to Dextran-derivatised Iron Oxide Nanoparticles Post Internalisation”, *Biomaterials* 25, no. 23 (October 2004): 5405–5413.
- ¹¹⁸ Zhang X, Haaf M, Todorich B, Grosstephan E, Schieremberg H, Surguladze N, Connor JR, “Cytokine Toxicity to Oligodendrocyte Precursors Is Mediated by Iron”, *Glia* 52, no. 3 (November 15, 2005): 199–208.
- ¹¹⁹ Otto C, Heeg A, Kottenmeier S, Kuckein O, Schneiker B, Gahn S, Germer CT, Steger U, “Immunisation with an Allogeneic Peptide Promotes the Induction of Antigen-specific MHC II(pos) CD4+ Rat T Cells Demonstrating Immunostimulatory Properties”, *Transplant Immunology* 26, no. 4 (June 2012): 220–229.
- ¹²⁰ Ahmadi KR, Hall MA, Norman P, Vaughan RW, Snieder H, Spector TD, Lanchbury JS, “Genetic determinism in the relationship between human CD4+ and CD8+ T lymphocyte populations?”, *Genes and Immunity* 2, no. 7 (November 2001): 381–387.
- ¹²¹ Lu X, Liu JF, Gong YF, Wang ZP, Liu Y, Zhang Q, “Mapping quantitative trait loci for T lymphocyte subpopulations in peripheral blood in swine”, *BMC Genetics* 12 (2011): 79.
- ¹²² Horne PH, Zimmerer JM, Fisher MG, Lunsford KE, Nadasdy G, Nadasdy T, van Rooijen N, Bumgardner GL, “Critical Role of Effector Macrophages in Mediating

CD4-dependent Alloimmune Injury of Transplanted Liver Parenchymal Cells”, *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 181, no. 2 (July 15, 2008): 1224–1231.

¹²³ Lorenz M, Regele H, Schillinger M, Exner M, Rasoul-Rockenschaub S, Wahrmann M, Kletzmayer J, Silberhumer G, Hörl WH, Böhmig GA, “Risk Factors for Capillary C4d Deposition in Kidney Allografts: Evaluation of a Large Study Cohort”, *Transplantation* 78, no. 3 (August 15, 2004): 447–452.

¹²⁴ 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* 123, no. 5 (November 2002): 1677–1685.

¹²⁵ Nussler A, König S, Ott M, Sokal E, Christ B, Thasler W, Brulport M, Gabelein G, Schormann W, Schulze M, Ellis E, Kraemer M, Nocken F, Fleig W, Manns M, Strom SC, Hengstler JG, “Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases”, *Journal of Hepatology* 45, no. 1 (July 2006): 144–159.

¹²⁶ Nagata H, Ito M, Shiota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ, “Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen”, *Transplantation* 76, no. 4 (August 27, 2003): 732–734.

¹²⁷ Wiesner RH, Demetris AJ, Belle SH, Seaberg EC, Lake JR, Zetterman RK, Everhart J, Detre KM, “Acute hepatic allograft rejection: incidence, risk factors, and impact on outcome”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 28, no. 3 (September 1998): 638–645.

¹²⁸ Louie AY, Hüber MM, Ahrens ET, Rothbacher U, Moats R, Jacobs RE, Fraser SE, Meade TJ, “In vivo visualization of gene expression using magnetic resonance imaging”, *Nature Biotechnology* 18, no. 3 (March 2000): 321–325.

¹²⁹ Dagher I, Boudechiche L, Branger J, Coulomb-Lhermine A, Parouchev A, Sentilhes L, Lin T, Groyer-Picard MT, Vons C, Hadchouel M, Pariente D, Andreoletti M, Franco D, Weber A, “Efficient hepatocyte engraftment in a nonhuman primate model after partial portal vein embolization,” *Transplantation* 82, no. 8 (October 27, 2006): 1067–1073.

¹³⁰ Yamanouchi K, Zhou H, Roy-Chowdhury N, Macaluso F, Liu L, Yamamoto T, Yannam GR, Enke C, Solberg TD, Adelson AB, Platt JL, Fox IJ, Roy-Chowdhury J, Guha C, “Hepatic irradiation augments engraftment of donor cells following hepatocyte transplantation”, *Hepatology (Baltimore, Md.)* 49, no. 1 (January 2009): 258–267.

¹³¹ Michalopoulos GK, “Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas”, *The American Journal of Pathology* 176, no. 1 (January 2010): 2–13.

¹³² Sancho-Bru P, Najimi M, Caruso M, Pauwelyn K, Cantz T, Forbes S, Roskams T, Ott M, Gehling U, Sokal E, Verfaillie CM, Muraca M, “Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside?”, *Gut* 58, no. 4 (April 2009): 594–603.

¹³³ Ito M, Nagata H, Miyakawa S, Fox IJ, “Review of hepatocyte transplantation”, *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* 16, no. 2 (2009): 97–100.

¹³⁴ Mei J, Sgroi A, Mai G, Baertschiger R, Gonelle-Gispert C, Serre-Beinier V, Morel P, Bühler LH, “Improved survival of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated cryopreserved porcine hepatocytes in mice”, *Cell Transplantation* 18, no. 1 (2009): 101–110.

¹³⁵ Ballardur P, Honiger J, Calmus Y, Vaubourdolle M, Delelo R, Capeau J, Nordlinger B, “Transplantation of allogeneic hepatocytes without immunosuppression: long term survival”, *Bulletin De l’Académie Nationale De Médecine* 178, no. 3 (March 1994): 569–575; discussion 576–578.

¹³⁶ Liu ZC, Chang TMS, “Coencapsulation of hepatocytes and bone marrow cells: in vitro and in vivo studies”, *Biotechnology Annual Review* 12 (2006): 137–151.

¹³⁷ Ostrowska A, Karrer FM, Bilir BM, “Histological identification of purified and cryopreserved allogeneic hepatocytes following transplantation in a murine model without host immunosuppression”, *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation* 12, no. 3 (1999): 188–194.

7. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Niebergall, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der immunologische Status nach Transplantation MPIO-markierter Hepatozyten im Großtiermodell“ 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

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Sarah Niebergall, geb. Schmeißer hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

Publikation 1: Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, **Schmeisser S**, Adonopoulou M, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. Cell Medicine, Part B of Cell Transplantation, Vol. 1, pp. 123-135, 2010

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen):

Durchführung der Versuche im Labor (Leberzellisolierung und –markierung), Vorbereiten der Tiere (Narkose) für die MRT sowie Betreuung der Tiere während der MRT-Aufnahmen, regelmäßiges Verabreichen der Immunsuppression.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Raschzok N, Teichgräber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, **Schmeisser S**, Adonopoulou M, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rüdinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. Cell Medicine, Part B of Cell Transplantation, Vol. 1, pp. 123-135, 2010

10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Igor M. Sauer für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Themas bedanken. Die Zusammenarbeit war stets ungezwungen und motivierend. Ferner gebührt mein Dank meiner Betreuerin Dr. med. Martina Mogl, insbesondere ihre freundliche, herzliche und immer unterstützende Art müssen hierbei hervorgehoben werden.

Prof. Dr. Birgit Sawitzki vom Institut für Medizinische Immunologie der Charité bin ich für die zur Verfügungstellung ihres Labors und Beiseitstellen ihrer Mitarbeiter für die Durchführung eines Teils meiner Arbeit sowie für ihre andauernd prompte und kompetente und sehr freundliche Hilfestellung und Beantwortung meiner Fragen zu großem Dank verpflichtet, sie hat oft Licht in mein Immunologiedunkel gebracht.

Meiner lieben Freundin Anja Metzner habe ich die Entdeckung der Arbeitsgruppe und die Kontaktaufnahme zu unserem Doktorvater zu verdanken. Ihr, Dr. med. Kirsten Steinz, Dr. Nils Billecke und PD Dr. med. Nathanael Raschok ist für die kollegiale Zusammenarbeit zu danken.

Meinen Eltern schulde ich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Arbeit an der Dissertation sowie für ihre nüchterne, unaufgeregte und nie Druck ausübende Haltung größten Dank.

Meinem Ehemann Florian Niebergall sage ich für die überaus häufige Bereitstellung seines PCs zu kaum verzichtbaren Zeiten danke. Seine regelmäßigen Erinnerungen haben mir immer wieder die Beendigung dieser Dissertation zurück ins Gedächtnis gerufen.

„Denn ohne mich könnt ihr nichts tun“ (Die Bibel, Johannes 15,5). Dem Größten gebührt mein größter Dank.