

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

## **DISSERTATION**

Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung humaner Hepatozyten  
und nicht-parenchymaler Leberzellen für pharmakologische  
Untersuchungen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Elisa Pfeiffer

aus Neubrandenburg

Datum der Promotion: 22.09.2017

# Inhalt

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	2
1 Einleitung .....	3
2 Methodik .....	4
2.1 Isolierung humaner Leberzellen .....	4
2.2 Identifizierung und Charakterisierung von NPC .....	5
3 Ergebnisse .....	7
3.1 Isolierung und Identifizierung humaner Leberzellen .....	7
3.2 Charaktersierung und Aktivierung von NPC .....	8
4 Diskussion .....	10
5 Literatur .....	15
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	
Eidesstattliche Versicherung	
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen	
Lebenslauf	
Publikationsliste	
Danksagung	

## Zusammenfassung

Untersuchungen an primären humanen Hepatozyten (PHH) gelten als der Goldstandard für die Analyse von Fremdstoffmetabolismus und Hepatotoxizität *in vitro*. PHH Monokulturen sind jedoch in ihrer Lebensdauer und Funktionalität stark limitiert. Komplexe Wirkungsmechanismen können nur unzureichend abgebildet werden. Hepatische nicht-parenchymale Zellen (NPC), wie Kupffer-Zellen (KC), Leberendothelzellen (LEC) und hepatische Sternzellen (HSC) spielen eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der PHH-Funktionen, sowie bei regenerativen und pathophysiologischen Vorgängen der Leber. Zur Entwicklung funktionaler und reproduzierbarer *in vitro* Lebermodelle ist die Verfügbarkeit von parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen in definierter Qualität und Quantität unverzichtbar. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines Protokolls für die parallele Isolierung von humanen PHH und NPC aus dem Lebergewebe eines Donors, sowie die Untersuchung zellspezifischer Eigenschaften für eine potenzielle Nutzung der Zellen in *in vitro* Lebersystemen.

Humane PHH und NPC wurden aus gesundem Lebergewebe nach partieller Leberresektion durch eine Zwei - Schritt EDTA / Kollagenase-Perfusions Technik isoliert. Die erhaltenen Zellfraktionen wurden durch Percoll-Dichtegradientenzentrifugationen gereinigt und durch spezifische Adhärenzeigenschaften, sowie eine magnetisch aktivierte Zellsortierung (MACS®) separiert. KC, LEC und HSC wurden identifiziert und in Monokulturen kultiviert. Anhand zelltypspezifischer Eigenschaften wurden das Verhalten und die Stabilität der NPC in Kultur charakterisiert.

Pro Gramm Lebergewebe konnte eine Ausbeute von  $1,9 \times 10^6$  KC,  $2,7 \times 10^5$  LEC und  $4,7 \times 10^5$  HSC, mit einer Viabilität von  $> 90\%$  erzielt werden. Die funktionelle Charakterisierung der NPC zeigte eine Aktivierung aller Zellpopulationen in Kultur. Eine Aktivierung der KC, gepaart mit einem starken Viabilitätsverlust wurde innerhalb von 4 - 5 Tagen registriert. Die LEC verloren in Kultur zellspezifische Besonderheiten, während die HSC einen Transformationsprozess in einen Myofibroblasten ähnlichen Zelltyp durchliefen. Die Untersuchung verschiedener Kulturbedingungen für HSC zeigte, dass eine Dedifferenzierung der Zellen *in vitro* abgeschwächt, aber nicht vollständig verhindert werden konnte. Das beschriebene Verfahren ermöglicht erstmals eine gleichzeitige Isolierung und Trennung von humanen PHH und NPC in hoher Qualität und Ausbeute.

## Abstract

Use of primary human hepatocytes (PHH) is considered to be the gold standard for the *in vitro* study of drug metabolism and hepatotoxicity. PHH monocultures are quite limited in its life and functionality. Complex mechanisms of action can only be displayed insufficiently. Hepatic non-parenchymal cells (NPC) as Kupffer cells (KC), liver endothelial cells (LEC) and hepatic stellate cells (HSC) play a central role in maintaining the PHH functions, as well as in regenerative and pathophysiological processes of the liver. To develop functional and reproducible *in vitro* liver models, the availability of parenchymal and non-parenchymal liver cells in a defined quality and quantity is essential. The aim of the present study was to establish a protocol for the parallel isolation of human PHH and NPC from the liver tissue of one donor, and the study of cell-specific properties for a potential use of those cells in *in vitro* liver systems. Human PHH and NPC were isolated from healthy liver tissue following partial hepatectomy by a two - step EDTA / collagenase perfusion technique. The obtained cell fractions were purified by a Percoll density gradient centrifugation and separated by specific adherence properties and a magnetically activated cell sorting (MACS®). KC, LEC and HSC were identified and cultured in monocultures. Using cell-type specific properties the behavior and stability of NPC were characterized in culture. Per gram of liver tissue there was a yield of  $1.9 \times 10^6$  KC,  $2.7 \times 10^5$  LEC and  $4.7 \times 10^5$  HSC achieved, with a viability of > 90%. Functional characterization of NPC showed an activation of all populations in culture. Activation of the KC, coupled with a strong lost of viability was registered within 4 - 5 days. LEC lost in culture cell-specific characteristics, while HSC underwent a process of transformation into a myofibroblast-like cell type. The study of different culture conditions for HSC showed that the dedifferentiation of the cells was attenuated *in vitro*, but could not be completely prevented. The procedure described allows the simultaneous isolation and separation of human PHH and NPC in a high quality and yield.

# 1 Einleitung

Die humane Leber zeichnet sich durch eine komplexe Struktur verschiedener Zellpopulationen aus. Die parenchymalen Hepatozyten (PHH) entsprechen rund 80% der Leberzellen und sind verantwortlich für die Mehrheit der Leberfunktionen wie Energiestoffwechsel, Gallensäure-Synthese und die Biotransformation von Xenobiotica.[1] Die nicht-parenchymale Leberfraktion, einschließlich der Kupffer Zellen (KC), der Leberendothelzellen (LEC) und der hepatischen Sternzellen (HSC), stellt einen Anteil von rund 20% der Leberzellen dar. Nicht-parenchymale Leberzellen spielen sowohl bei physiologischen Leberfunktionen, als auch bei pathophysiologischen Vorgängen wie akuten hepatischen Entzündungen, Arzneimittel-induzierter Leberschädigung (DILI), sowie chronischen Lebererkrankungen wie Leberfibrose und Zirrhose eine zentrale Rolle.[2] KC bilden als residente Makrophagen der Leber einen wichtigen Teil der systemischen und regionalen Abwehr. Durch die Synthese von Cytokinen, Prostaglandinen und reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) sind sie an der Antwort der Leber auf Infektionen, Toxine, Ischämie, Resektion und andere Belastungen eng beteiligt.[3] Die LEC können je nach Lokalisation in ihrem Phänotyp variieren.[4] Sinusoidale LEC (LSEC) bilden eine physiologische Barriere zwischen den Hepatozyten und dem Blutstrom.[5] Zahlreiche Fenestrations, sogenannte Siebplatten, ermöglichen einen umfangreichen Stoffaustausch.[6] Die hepatischen Sternzellen, auch als Fettspeicherzellen oder Itozellen bekannt, sind im Dissé Raum lokalisiert. Sie spielen eine zentrale Rolle im Vitamin A Stoffwechsel und speichern rund 80% des Retinols im Körper. Aktivierte HSC differenzieren zu Myofibroblasten. Bedingt durch eine erhöhte Synthese Extra Zellulärer Matrix (ECM) führt dies zur Leberfibrose.[7] PHH Monokulturen gelten nach wie vor als der Goldstandard für Untersuchungen zu Fremdstoffmetabolismus und Hepatotoxizität *in vitro*. [8] Diese vereinfachten Lebermodelle sind jedoch in ihrer Wirkungsweise und Aussagekraft stark limitiert. In der Monokultur kommt es zur Dedifferenzierung der PHH und einem daraus resultierenden Funktionsverlust innerhalb weniger Tage.[2] Auch weiterentwickelte dreidimensionale (3D) PHH Modelle sind noch nicht in der Lage komplexe Wirkungsmechanismen vergleichbar mit der *in vivo* Situation zu reproduzieren.[2, 5] Die fehlende Zell-Zell Kommunikation zwischen PHH und NPC wird als ein entscheidender Mangel beschrieben.[9] NPC gewannen in den letzten Jahren für die Entwicklung humaner Lebermodelle und im *Tissue Engineering* zunehmend an

Bedeutung.[10, 11] Zur Etablierung standardisierter Lebermodelle, basierend auf definierten Zellpopulationsanteilen, werden Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Hepatozyten und NPC dringend benötigt. Die Isolierung einzelner NPC Populationen beschränkte sich vornehmlich auf nicht humane Spezies.[12-14] Protokolle zur Isolierung humaner NPC sind bisher nur vereinzelt verfügbar.[15, 16] Die Nutzung humaner PHH und NPC Populationen aus Lebergewebe, welches im Rahmen einer medizinisch indizierten Leberteilresektion anfällt, bietet einen neuen richtungsweisenden Ansatz für die Leberzellisolierung und ermöglicht eine umfangreichere Darstellung der humanen Leberfunktionen *in vitro*.

In der vorliegenden Studie stellen wir ein Protokoll, für eine unkomplizierte und effektive Isolierung und Trennung von PHH, KC, LEC und HSC aus Lebergewebe vor. Alle Zelltypen wurden erfolgreich identifiziert und in Monokulturen kultiviert. Durch die Untersuchung zellspezifischer Eigenschaften wurden die isolierten NPC hinsichtlich ihrer Qualität und Stabilität charakterisiert.

## **2 Methodik**

### **2.1 Isolierung humaner Leberzellen**

Die Isolierung der humanen Leberzellen erfolgte nach partieller Leberresektion aus makroskopisch tumorfreiem Gewebe von Patienten mit primärer oder sekundärer Tumorerkrankung der Leber (Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité Universitätsmedizin Berlin). Die Nutzung des Lebergewebes für Forschungszwecke wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt, eine Patienteneinwilligung lag nach ärztlicher Aufklärung vor.

Primäre Hepatozyten und nicht-parenchymale Leberzellen (KC, LEC, HSC) wurden direkt nach der chirurgischen Resektion unter sterilen Bedingungen schrittweise aus dem tumorfreien Lebergewebe desselben Gewebespenders gewonnen. Die Isolierung der PHH erfolgte durch eine modifizierte Zwei-Schritt EDTA / Kollagenase Perfusionstechnik nach Nüssler et al. 2009.[17] Das Lebergewebe wurde kanüliert und mit 500 ml Perfusionslösung mit EGTA gereinigt und im Anschluss für maximal 15 min mit 100 ml Perfusionslösung, angereichert mit 100 mg Kollagenase P und 10% Fötalem Kälberserum (FCS), unter Rezirkulation verdaut. Der enzymatische Verdau wurde durch 500 ml PBS mit 100 ml FCS abgestoppt. Die Leberzellen wurden vorsichtig aus dem Gewebe geschüttelt und mittels eines Gazefilters filtriert. Zur Separation der PHH und der NPC-Fraktion wurde die erhaltene Zellsuspension initial

bei 50 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet enthielt die PHH Fraktion. Der Überstand wurde auf Eis gelagert und im Anschluss für die NPC-Isolierung verwendet. Zur Separation nicht lebensfähiger Zellen wurden die PHH einer 25% Percoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation unterzogen. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer mit Hilfe der Trypanblau-Färbung gezählt und in PHH Kulturmedium auf Kollagen beschichteten Zellkulturgefäßen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator kultiviert.

Die NPC-Isolierung erfolgte aus dem Überstand der initialen Zentrifugation der PHH Gewinnung. Nach weiteren Zentrifugationsschritten zur Aufreinigung und Einengung der gesuchten Zellarten wurde eine Zwei-Schichten (25%/50%) Percoll Dichte-Gradienten-Zentrifugation vorgenommen. Die NPC-enhaltene Fraktion hatte sich in der Interphase zwischen der 25% und der 50% Percoll Schicht angereichert. KC adhären in geringer Zeit auf dem Kunststoff von Zellkulturplatten.[13] Diese Eigenschaft wurde genutzt, um die KC von den restlichen Zellen zu separieren. Die KC wurden in der NPC Zellsuspension in der Neubauerzählkammer mittels Trypanblau-Färbung gezählt und in definierter Anzahl in Kulturgefäßen ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 20 min, bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wurde der Überstand entfernt und die adhärenierten KC wurden in Kulturmedium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator kultiviert. Der Überstand der KC Isolierung enthielt die LEC und die HSC Populationen. Die Separation der LEC erfolgte durch das magnetisch aktivierte Zellsortierungssystem MACS® (Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland). Die Zellen wurden mit CD31 konjugierten *MicroBeads* markiert. Mittels einer magnetischen Säule wurden die CD31<sup>+</sup> positiven LEC von den CD31<sup>-</sup> negativen HSC separiert. Die CD31<sup>+</sup> LEC wurden in der Trennsäule im magnetischen Feld gehalten, während die CD31<sup>-</sup> HSC die Säule passieren konnten. Die Zellen wurden in der Neubauerzählkammer mittels Trypanblau-Färbung gezählt, in Kulturmedium ausgesät und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einem Inkubator kultiviert. Ein Medium-Wechsel erfolgte für alle Zellpopulationen alle 24 h.

## **2.2 Identifizierung und Charakterisierung von NPC**

Die Identifizierung der isolierten humanen Leberzellen erfolgte durch die Untersuchung morphologischer Charakteristika und einer anschließenden Immunfluoreszenzfärbung zelltypspezifischer Antigene. Hepatozyten wurden primär mit CK18, Kupffer Zellen mit CD68, Leberendothelzellen mit Vimentin und die Hepatischen Stern Zellen mit dem

*Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP), sowie einem fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörper gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

Eine funktionelle Charakterisierung erfolgte anhand zelltypspezifischer Eigenschaften. Zum Nachweis phagozytotischer Aktivität wurden die KC mit  $4 \times 10^6$  FITC markierten *Fluoresbrite™ Plain YG 3.0 Microspheres* pro Million KC über 24 h kultiviert. Die Fluoreszenz der phagozytierten *LatexBeads* wurde im Fluoreszenzmikroskop detektiert. Die Synthese von ROS diente als Marker für eine Aktivierung der KC. Der Nachweis der ROS Bildung erfolgte durch den *DCF Assay*. Der Test basiert auf der Acetylierung von Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (DCFH-DA) durch zelluläre Esterasen und die Oxidation durch ROS zu dem fluoreszierenden Dichlorodihydrofluorescein (DCF). Die Messung der KC Aktivierung erfolgte über 5 Tage in Kultur. Für LEC ist die Pinozytose von acetyliertem Low Density Lipoprotein (LDL) spezifisch. Nach einer Inkubation der LEC mit 3,3'-di-octadecyloxycarbocyanine perchlorat (DiO-Ac-LDL) über 4h wurde die Emission des pinozytierten LDL im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Native sinusoidale LEC zeichnen sich durch oberflächliche Fenestrationsen, sogenannte Siebplatten aus. Es erfolgte eine Rasterelektronenmikroskopie der LEC an Tag 1 und 2 der Kultivierung zur Untersuchung der Siebplatten.

HSC besitzen eine spezifische blau-grüne Eigenfluoreszenz ihrer Retinol-Speicher, welche bei einer Wellenlänge von 328nm mittels Fluoreszenzmikroskop detektiert wurde. Aktivierte HSC transdifferenzieren in einen fibroblastenähnlichen Zelltyp. Eine Transdifferenzierung der HSC wurde anhand der Synthese extrazellulärer Matrixproteine mit Hilfe des kalorimetrischen Sulforhodamin B (SRB) Assay, sowie über die Expression des *alpha Smooth Muscle Actin* ( $\alpha$ SMA) über 5 Tage nachgewiesen. Neben einer zeitabhängigen Aktivierung wurde zusätzlich der Einfluss der Plattenbeschichtung auf die Umwandlung der HSC untersucht. Die HSC wurden dafür in unbehandelten, sowie in mit *Matrigel®* und Rattenschwanzkollagen beschichteten Kulturgefäßen kultiviert.

Zur Viabilitätskontrolle während der Kultivierung wurde die mitochondrielle Aktivität der isolierten Zellen herangezogen. Diese wurde mit Hilfe des kalorimetrischen XTT-Assay nachgewiesen. Eine proliferative Kapazität der verschiedenen NPC Populationen wurde mit Hilfe einer immunhistologischen Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67 an Tag 3 der Kultivierung analysiert.

### 3 Ergebnisse

Das entwickelte Isolierungsverfahren ermöglichte eine parallele Isolierung humaner PHH und NPC in hoher Qualität und Ausbeute. Aus der NPC Fraktion konnten KC, LEC und HSC erfolgreich isoliert und kultiviert werden. Eine Übersicht über das Isolierungsverfahren ist in Abbildung 1 angegeben. Der Isolierungsvorgang kann zusätzlich anhand des Videoprotokolls von Kegel et al. 2016 nachvollzogen werden.[18] Die isolierten Zellen konnten anhand morphologischer Besonderheiten und des immunhistologischen Nachweises zelltypspezifischer Antigene identifiziert werden.

#### 3.1 Isolierung und Identifizierung humaner Leberzellen

Die isolierten PHH waren durch ein großes zytoplasmatisches Volumen mit unterschiedlichen Mengen an Lipidtröpfchen und einer Polyploidie gekennzeichnet. In Suspension betrug der Zelldurchmesser rund 20 bis 30  $\mu\text{m}$ . In der Monokultur zeigten sie eine typische kubische Anordnung. Die Ausbeute an PHH betrug  $14,8 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$  viable PHH / g Lebergewebe (n=12) mit einer durchschnittlichen Viabilitätsrate von  $76,6 \pm 4,2\%$  und einer Reinheit von  $92,3 \pm 3,2\%$ . Sie waren positiv für den Hepatozyten Marker CK18. KC dominierten die NPC-Fraktion. Die KC wurden durch ihre selektive Adhärenz auf Zellkulturplastik separiert. Sie waren durch eine geringe Größe mit prominentem Zellkern gekennzeichnet und konnten mit einer Ausbeute von  $1,9 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$  viable KC / g Lebergewebe (n=5) isoliert werden. Die Gesamtviabilität der KC betrug  $92,8 \pm 3,5\%$ . Die Reinheit der KC Population betrug  $81,0 \pm 5,4\%$ . Die isolierten KC zeigten eine Immunreaktivität für das makrophagen-spezifische Oberflächenprotein CD68. Ihre Fähigkeit zur Phagozytose konnte mittels fluoreszierender Latexkügelchen, im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Die isolierten LEC hatten in Suspension einen Durchmesser von etwa 10  $\mu\text{m}$  und waren durch mehrere Granula gekennzeichnet. Sie zeigten ein spindelförmiges Aussehen mit einem ovalen Zellkern. Die Ausbeute der LEC betrug  $2,7 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$  viable LEC / g Lebergewebe (n=8) mit einer Gesamtviabilität von  $95,6 \pm 2,8\%$  und einer Reinheit von  $81,0 \pm 1,7\%$ . Zur Isolierung der LEC wurde das MACS<sup>®</sup> Trennverfahren genutzt. Dabei konnten die Zellen über eine Markierung mit CD31 konjugierten *MikroBeads* selektiert werden. Die Expression des mesenchymalen Zellmarker Vimentin wurde

immunhistologisch nachgewiesen. Die pinozytotische Aufnahme von acetyliertem LDL konnte im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Die CD31<sup>-</sup> negativen HSC waren durch ihre runde Zellform, eine granulierte Oberfläche, sowie eine Vielzahl charakteristischer Lipidtröpfchen gekennzeichnet. Die Ausbeute der isolierten HSC betrug  $4,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$  viable HSC / g Leber (N=8), mit einer Gesamtviabilität von  $89,6 \pm 3,8\%$ . Sie konnten durch eine Immunfluoreszenzfärbung von GFAP mit einer Reinheit von  $93,0 \pm 1,7\%$  identifiziert werden. Die charakteristischen Retinol-Speicher der HSC konnten als blau-grüne Autofluoreszenz detektiert werden.

### **3.2 Charaktersierung und Aktivierung von NPC**

Es erfolgte eine Analyse morphologischer und funktioneller Eigenschaften der NPC Populationen. Das Verhalten und die Stabilität der isolierten Zellen in Monokulturen wurden über 5 Tage untersucht.

KC Aktivität ist durch die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) gekennzeichnet, welche durch den DCF Assay nachgewiesen wurde. Die Messungen der ROS Level zeigten unmittelbar nach dem Isolierungsprozess eine breite Variation. Es konnten Unterschiede in der KC Aktivierung hinsichtlich Spenderanamnese und Gewebequalität festgestellt werden. Bei KC, isoliert aus dem Bereich der chirurgischen Resektionsgrenze, wurde die höchste ROS Bildung detektiert. Die Viabilität der isolierten KC in Kultur verringerte sich kontinuierlich über einen Zeitraum von 5 Tagen. Ein Anstieg der ROS Bildung konnte bis Tag 2 gemessen werden. Korrelierend mit dem beobachteten Viabilitätsverlust, sanken die ROS Level ab Tag 3. Proliferationsaktivitäten der kultivierten KC konnten durch die Immunfluoreszenzfärbung des Proliferationsmarker Ki67 nicht nachgewiesen werden.

Für die isolierten LEC konnte in Kultur eine stetige Zunahme der mitochondrialen Aktivität nachgewiesen werden. Zellschädigungen wurden während der gesamten Kulturdauer nicht beobachtet. Das Auftreten von Fenestrations in der Zelloberfläche ist charakteristisch für sinusoidale LEC. In der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung konnten größere Zwischenräume zwischen den einzelnen Zellen als Ausläufer der Zell-Zell-Kontakte beobachtet werden. Die LEC zeigten diffuse punktuelle Oberflächenstrukturen, welche jedoch nicht eindeutig als Fenestrations bestimmt werden konnten. Eine Proliferation von

LEC in Kultur konnte durch die Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 nachgewiesen werden.

Die HSC Kulturen zeigten eine Zunahme in der Reinheit ihrer Zellpopulation von 93% an Tag 1 auf 98% an Tag 5. Eine Zunahme der mitochondrialen Aktivität wurde parallel dazu gemessen. Zellschädigungen oder Verluste konnten nicht beobachtet werden. Die morphologische Untersuchung der HSC Kulturen zeigte, dass die Zellen einen Aktivierungsprozess innerhalb der Kultivierungsdauer von 5 Tagen durchliefen. Die Zellen transformierten in einen Fibroblasten ähnlichen Zelltyp. Die Transdifferenzierung verbunden mit einer gesteigerten Expression von  $\alpha$ SMA konnte fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Eine erhöhte Synthese extrazellulärer Matrixproteine wurde mittels SRB Assay detektiert. Die Fähigkeit der HSC zur Proliferation in Kultur wurde durch eine positive Immunfärbung des Proliferationsmarkers Ki67 bestätigt.

Um einen möglichen Einfluss des Beschichtungsmaterials auf den Transformationsprozess der HSC zu untersuchen, wurden Kollagen- und *Matrigel*<sup>®</sup>-beschichtete sowie nicht beschichtete Kulturgefäße verglichen. Die Aktivierung der HSC in Kultur über 5 Tage wurde anhand der  $\alpha$ SMA Expression bewertet. Die Zellen adhärirten am besten auf Kollagen beschichteten Platten. Unterschiede im Aktivierungsstatus in Abhängigkeit von der Plattenbeschichtung konnten nicht gezeigt werden. An Tag 3 wiesen alle HSC Populationen eine erhöhte Expression von  $\alpha$ SMA auf, was auf eine Transformation der HSC in Myofibroblasten hinweist.

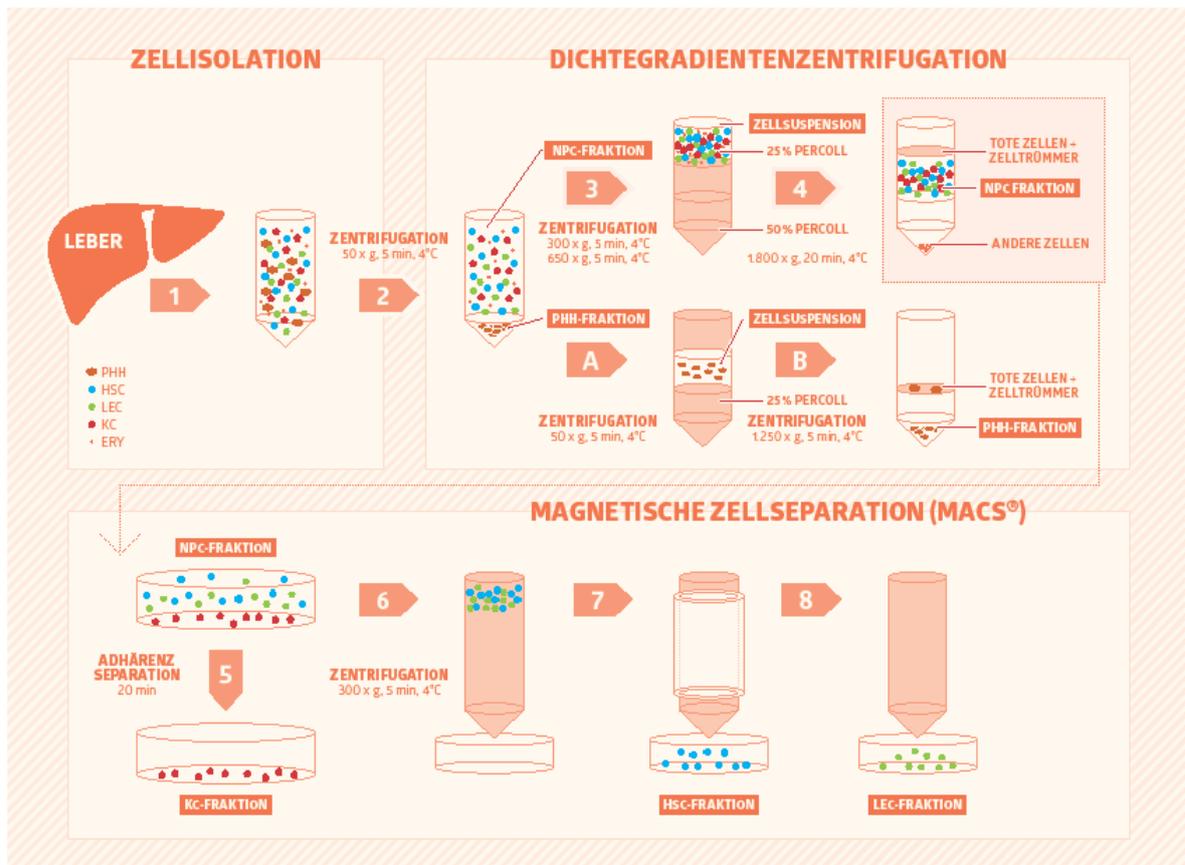


Abbildung modifiziert aus: Pfeiffer, E. et al., *Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells*. Exp Biol Med, 2015

**Abbildung 1:** Schematische Übersicht über die Isolierung von PHH und NPC aus humanem Lebergewebe. Die humanen Leberzellen wurden durch eine zweistufige EGTA / Kollagenase P Perfusionstechnik isoliert. Die PHH wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt von den restlichen Zellen getrennt und durch eine Percoll Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die NPC-Fraktion (KC, LEC, HSC) wurde in der verbliebenen Zellsuspension durch eine Zwei-Schichten (25%/50%) Percoll Dichtegradientenzentrifugation eingengt. Die enthaltenen KC wurden aus der NPC-Fraktion durch Adhärenztrennung separiert. LEC und HSC wurden durch MACS® getrennt. Die LEC wurden mit CD31<sup>+</sup> *MicroBeads* markiert. Die CD31<sup>-</sup> negativen HSC durchliefen die MACS® Trennsäule. Die CD31<sup>+</sup> LEC wurden in der Trennsäule gehalten und durch die Entfernung aus dem magnetischen Feld freigegeben.

## 4 Diskussion

Die Nutzung parenchymaler und nicht-parenchymaler Leberzellen in einer definierten Qualität und Quantität ist für die Etablierung funktionaler und reproduzierbarer humaner Leberzell-Co-Kulturen und *in vitro* Lebermodelle, unverzichtbar. Die Verfügbarkeit dieser ist jedoch stark limitiert. Der Zugang zu humanem Lebergewebe ist nur wenigen Forschungsgruppen vorbehalten. Ein hohes Maß an methodischer Expertise und logistischer Organisation ist für die Arbeit mit humanen Leberzellen erforderlich. Ausführliche Protokolle für die Isolierung humaner parenchymaler und nicht-parenchymaler Leberzellen waren

bisher nicht verfügbar. In der vorliegenden Studie haben wir ein Protokoll für die parallele Isolierung und Trennung humaner PHH und der nicht-parenchymalen KC, LEC und HSC entwickelt. Die Zellen wurden aus dem Gewebe chirurgischer Leberresektate eines Gewebespenders in hoher Reinheit und Qualität isoliert. Die NPC konnten in Monokulturen erfolgreich kultiviert werden. Die Zelltypen wurden eindeutig durch die Analyse spezifischer morphologischer Zelleigenschaften, sowie eine Immunfluoreszenz Färbung zelltypspezifischer Antigene identifiziert. Zellspezifische Merkmale und ihr Verhalten *in vitro* wurden während einer definierten Kultivierungszeit, zur Beurteilung ihrer Eignung für funktionelle Co-Kultur Systeme, untersucht.

Die meisten verfügbaren Veröffentlichungen befassen sich mit der Isolierung einzelner NPC Populationen nicht-humaner Spezies. Aufgrund artspezifischer Unterschiede können diese Daten jedoch nicht direkt auf den Menschen übertragen werden.[6, 13, 14] Protokolle zur Isolierung humaner primärer NPC sind in der Literatur bisher selten. Das vorliegende Protokoll basiert auf einer etablierten PHH Isolierungsmethode.[17] Diese wurde modifiziert und um die selektive Isolierung von KC, LEC und HSC erweitert. Somit ist es möglich große Mengen an PHH und NPC in hoher Qualität und Quantität parallel zu isolieren. Unsere erzielten Zellausbeuten sind vergleichbar mit den Ergebnissen aus Isolierungen einzelner Zellpopulationen anderer Arbeitsgruppen. Die Zellzahl isolierter KC betrug rund  $1,9 \times 10^6$  lebensfähiger KC / g Lebergewebe mit einer durchschnittlichen Viabilität von etwa 93% und einer Reinheit von rund 81%. Dies ist vergleichbar mit der Ausbeute an KC von Alabraba et al. (2007), diese isolierten rund  $2,3 \times 10^6$  KC / g Leber mit einer Viabilität und Reinheit von etwa 98% .[16] Die kultivierten KC wurden durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose von fluoreszierenden Latexkügelchen und das Makrophagen-spezifische Antigen CD68 identifiziert.[19] KC können durch verschiedene endogene Quellen aktiviert werden, wie z.B. Zytokine, Zelltrümmer von Nekrosen, und apoptotische Körperchen.[3] Aktivierte KC synthetisieren reaktive Sauerstoff Spezies als Teil des NF-kB Signalwegs. ROS haben ein hohes Potenzial als Marker für eine KC Aktivierung.[20] KC aus dem Lebergewebe junger gesunder Spender mit gutartigen Tumoren zeigten die niedrigsten KC Aktivierungslevel. Hohe initiale ROS Level wurden bei KC gemessen, die aus dem Bereich der chirurgisch verursachten Resektionsgrenze isoliert wurden. Eine verstärkte Vermittlung von Signalen durch das beschädigte Lebergewebe könnte

hierfür ursächlich sein. Bei KC von Patienten mit primären Lebertumoren, sekundären Erkrankungen oder therapeutischen Interventionen, wurden ebenfalls erhöhte ROS Messwerte detektiert. Die vorangegangene Schädigung des Lebergewebes scheint in der Erhöhung der KC Aktivierung zu resultieren. Diese Beobachtungen konnten in der Arbeit von Kegel et al. 2016 zur Aktivierung von isolierten humanen KC in einem humanen *in vitro* Modell bestätigt werden.[21] Die Kultivierungsbedingungen hatten ebenfalls einen Einfluss auf den Aktivierungszustand der KC. Eine zunehmende ROS Synthese / Zeit wurde bei einer gleichzeitiger Abnahme der Zellviabilität gemessen. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine initiale Zellaktivierung und der progressive Zelltod zu einer Aktivierung der verbleibenden KC führten.

Die LEC wurden von der restlichen NPC Fraktion durch die Verwendung von CD31<sup>+</sup> *MikroBeads* als Teil des magnetischen Zellsortierungs Systems MACS<sup>®</sup> getrennt. Die LEC wurden mit einer Ausbeute von rund  $2,7 \times 10^5$  viable LEC / g Lebergewebe mit einer Viabilität von ca. 96% und einer Reinheit von 81% isoliert. Für humane LEC wurden Ausbeuten zwischen  $10^3$  und  $10^6$  Zellen / Organ mit einer Reinheit von etwa 90% beschrieben.[22, 23] Die humane Leber enthält Endothelzellen unterschiedlichen Ursprungs, die LEC aus den venösen und arteriellen Gefäßen der Leber, sowie die sinusoidalen LEC. Letztere repräsentieren rund 2,5% des lobulären Parenchyms.[1] Die isolierten LEC Populationen waren positiv für den endothelialen Zellmarker CD31, sowie den mesenchymalen Zellmarker Vimentin.[24] Darüber hinaus ist die Aufnahme von acetyliertem LDL nachgewiesen worden, was charakteristisch für LEC ist.[25] Das Vorhandensein von Fenestrationsen ist ein zuverlässiger Marker für LSEC. Die ultrastrukturelle Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie konnte keinen eindeutigen Nachweis von Siebplatten an Tag 1 und 2 der Kultivierung hervorbringen. Ursächlich könnte entweder ein Verlust dieser Merkmale während der Kultur sein oder der Tatsache geschuldet sein, dass Fenestrationsen vollständig fehlten. Für CD31<sup>+</sup> positive LEC wird das Vorhandensein von Fenestrationsen kontrovers diskutiert.[26] Während unklar ist, ob sinusoidale LEC CD31<sup>+</sup> positiv sind, wird die Existenz eines Zwischenzelltyps vorgeschlagen, welcher CD31<sup>+</sup> positiv ist und weniger Fenestrationsen als reine LSEC hat.[27] Die isolierten LEC konnten unter zelltypspezifischen Bedingungen über mehrere Tage in Monokultur kultiviert

werden. Durch ihre Stabilität und die nachgewiesene Proliferationskapazität der LEC *in vitro*, sind diese gut für die Nutzung in *in vitro* Co - Kulturmodellen geeignet. Die HSC Fraktion konnte mit einer Zellzahl von  $4,7 \times 10^5$  viabler HSC / g Leber mit einer Viabilität von rund 90% und einer Reinheit von rund 93% isoliert werden. Sehr viel geringere Zellausbeuten von rund  $2,3 \times 10^5$  HSC / g Leber mit einer Reinheit von 91% wurden von Friedman et al. 1992 beschrieben.[15] Die isolierten HSC wurden durch ihre spezifische blau-grüne Autofluoreszenz der intrazellulären Retinolspeicher, sowie den positiven Signalen für den HSC Marker  $\alpha$ SMA und GFAP identifiziert.[28] Die Zellen konnten über mehrere Tage in Monokulturen kultiviert werden. Proliferationsaktivitäten wurde währenddessen nachgewiesen. Für die HSC wurde eine progrediente morphologische und physiologische Transformation, verbunden mit der erhöhten Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten und einer erhöhten Expression von  $\alpha$ SMA, beobachtet. Letzteres wird als zuverlässiger Marker für eine HSC Aktivierung beschrieben.[29] Eine erhöhte Bildung von Matrixproteinen und die Expression von  $\alpha$ SMA stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen.[29-31] Mögliche Ursachen für die HSC Aktivierung könnten der Zellsolierungsprozess selbst, als auch die Kulturbedingungen der HSC Monokulturen sein, welche den Transformationsprozess als Signal der Gewebeschädigung auslösen können. HSC adhärten auf verschiedenen beschichteten Kulturplatten in einer ungleichen Dichte. *Matrigel*<sup>®</sup> werden deaktiviere Eigenschaften bezüglich der HSC Transdifferentierung zugeschrieben.[32] Diese Ergebnisse konnten wir nicht bestätigen. Auf allen Matrixen wurden an Tag 3 erhöhte  $\alpha$ SMA Signale, sowie eine Erhöhung der Stoffwechselaktivität, gemessen durch den XTT Assay nachgewiesen. Die Untersuchungen zeigten, dass eine Aktivierung der HSC *in vitro* durch bestimmte Kulturbedingungen abgeschwächt, jedoch nicht verhindert werden kann.

Protokolle zur Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung nicht parenchymaler humaner Leberzellen sind selten und mehrheitlich nicht genau definiert. Bis zur Veröffentlichung unseres Protokolls, wurden keine Isolierungsverfahren beschrieben, die es ermöglichen die Mehrheit der humanen Leberzellen aus dem gleichen Gewebe zu isolieren, zu trennen und zu untersuchen. Die hier vorgestellte Methode ermöglicht die separate Gewinnung humaner Hepatozyten und der nicht-parenchymalen KC, LEC und HSC in einer hohen Reinheit und Qualität. Aktuell

werden viele Anstrengungen unternommen um gängige *in vitro* Lebermodelle zu verbessern. Die Kultivierung von PHH in 2D-Monokulturen führt zur Dedifferenzierung und einem starken Funktionsverlust.[33] Der Nachbau der *in vivo* Gewebearchitektur in einer 3D-Umgebung, einschließlich extrazellulärer Matrixkomponenten und NPC könnte einige dieser Probleme lösen.[34] Co-Kultursysteme und *in vitro* Lebergewebsmodelle, mit definierten Zellzahlen an PHH und NPC aus dem gleichen Spendergewebe, bieten einen neuen vielversprechenden Ansatz zur Untersuchung von Fremdstoffmetabolismus und Hepatotoxizität *in vitro*. Unser Protokoll [35], sowie die Videoveröffentlichung zum Isolierungsprozess von Kegel et al. 2016 [18] schaffen die Grundlage für neue Möglichkeiten in der Leberzellisolierung und der Etablierung funktionaler *in vitro* Lebermodelle.[36] Die Gewebespende-Anamnese beeinflusst die Qualität, die Quantität und den Aktivierungszustand der isolierten Zellen und verursacht interindividuelle Varianzen in den Ergebnissen der Isolierung und der Kultivierung von PHHs und NPCs. Das zeitliche Arbeitsfenster für die isolierten Zellen ist bisher auf wenige Tage, entsprechend der Zellqualität, begrenzt. Ein langfristiges Überleben, die Funktionalität und der Einfluss der NPC auf die Co-Kultursysteme und das konstruierte Lebergewebe müssen weiterhin untersucht werden.

## 5 Literatur

1. Si-Tayeb, K., F. P. Lemaigre & S. A. Duncan (2010) Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell*, 18, 175-89.
2. Godoy, P., N.J., Hewitt, U. Albrecht, M. E. Andersen, N. Ansari, S. Bhattacharya, J.G. Bode, J. Bolleyn, C. Borner, J. Bottger, A. Braeuning, R. A. Budinsky, B. Burkhardt, N. R. Cameron, G. Camussi, C.S. Cho, Y.J. Choi, J. Craig Rowlands, U. Dahmen, G. Damm, O. Dirsch, M.T. Donato, J. Dong, S. Dooley, D. Drasdo, R. Eakins, K. S. Ferreira, V. Fonsato, J. Fraczek, R. Gebhardt, A. Gibson, M. Glanemann, C. E. Goldring, M. J. Gomez-Lechon, G.M. Groothuis, L. Gustavsson, C. Guyot, D. Hallifax, S. Hammad, A. Hayward, D. Haussinger, C. Hellerbrand, P. Hewitt, S. Hoehme, H. G. Holzhutter, J. B. Houston, J. Hrach, K. Ito, H. Jaeschke, V. Keitel, J.M. Kelm, B. Kevin Park, C. Kordes, G. A. Kullak-Ublick, E. L. LeCluyse, P. Lu, J. Luebke-Wheeler, A. Lutz, D. J. Maltman, M. Matz-Soja, P. McMullen, I. Merfort, S. Messner, C. Meyer, J. Mwinyi, D. J. Naisbitt, A. K. Nussler, P. Olinga, F. Pampaloni, J. Pi, L. Pluta, S. A. Przyborski, A. Ramachandran, V. Rogiers, C. Rowe, C. Schelcher, K. Schmich, M. Schwarz, B. Singh, E. H. Stelzer, B. Stieger, R. Stober, Y. Sugiyama, C. Tetta, W. E. Thasler, T. Vanhaecke, M. Vinken, T.S. Weiss, A. Widera, C.G. Woods, J.J. Xu, K.M. Yarborough & J.G. Hengstler (2013) Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87, 1315-530.
3. Bilzer, M., F. Roggel & A. L. Gerbes (2006) Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int*, 26, 1175-86.
4. Sumpio, B. E., J. T. Riley & A. Dardik (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 34, 1508-12.
5. Kim, Y. & P. Rajagopalan (2010) 3D hepatic cultures simultaneously maintain primary hepatocyte and liver sinusoidal endothelial cell phenotypes. *PLoS One*, 5, e15456.
6. Tokairin, T., Y. Nishikawa, Y. Doi, H. Watanabe, T. Yoshioka, M. Su, Y. Omori & K. Enomoto (2002) A highly specific isolation of rat sinusoidal endothelial cells by the immunomagnetic bead method using SE-1 monoclonal antibody. *J Hepatol*, 36, 725-33.
7. Winau, F., C. Quack, A. Darموise & S. H. Kaufmann (2008) Starring stellate cells in liver immunology. *Curr Opin Immunol*, 20, 68-74.
8. Gomez-Lechon, M. J., J. V. Castell & M. T. Donato (2007) Hepatocytes--the choice to investigate drug metabolism and toxicity in man: in vitro variability as a reflection of in vivo. *Chem Biol Interact*, 168, 30-50.
9. Kasuya, J., R. Sudo, T. Mitaka, M. Ikeda & K. Tanishita (2011) Hepatic stellate cell-mediated three-dimensional hepatocyte and endothelial cell triculture model. *Tissue Eng Part A*, 17, 361-70.
10. Messner, S., I. Agarkova, W. Moritz & J. M. Kelm (2013) Multi-cell type human liver microtissues for hepatotoxicity testing. *Arch Toxicol*, 87, 209-13.
11. Friedman, S. L. & F. J. Roll (1987) Isolation and culture of hepatic lipocytes, Kupffer cells, and sinusoidal endothelial cells by density gradient centrifugation with Stractan. *Anal Biochem*, 161, 207-18.
12. Zhang, Q., Y. Qu, Z. Li, Q. Zhang, M. Xu, X. Cai, F. Li & L. Lu (2016) Isolation and Culture of Single Cell Types from Rat Liver. *Cells Tissues Organs*.
13. Zeng, W. Q., J. Q. Zhang, Y. Li, K. Yang, Y. P. Chen & Z. J. Liu (2013) A new method to isolate and culture rat kupffer cells. *PLoS One*, 8, e70832.
14. Chang, W., M. Yang, L. Song, K. Shen, H. Wang, X. Gao, M. Li, W. Niu & X. Qin (2014) Isolation and culture of hepatic stellate cells from mouse liver. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46, 291-8.
15. Friedman, S. L., D. C. Rockey, R. F. McGuire, J. J. Maher, J. K. Boyles & G. Yamasaki (1992) Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology*, 15, 234-43.
16. Alabraba, E. B., S. M. Curbishley, W. K. Lai, S. J. Wigmore, D. H. Adams & S. C. Afford (2007) A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells. *J Immunol Methods*, 326, 139-44.
17. Nüssler, A., N. Nüssler, V. Merk, M. Brulport, W. Schormann, P. Yao & J. Hengstler (2009) The Holy Grail of Hepatocyte Culturing and Therapeutic Use. *In: Santin M (ed.) Strategies in regenerative Medicine*.

18. Kegel, V., D. Deharde, E. Pfeiffer, K. Zeilinger, D. Seehofer & G. Damm (2016) Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells. *J Vis Exp*.
19. Kitani, H., T. Takenouchi, M. Sato, M. Yoshioka & N. Yamanaka (2010) A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells. *J Immunol Methods*, 360, 47-55.
20. Gandhi, C. (2011) Molecular pathology of liver diseases. *Molecular Pathology Library*, 81-95.
21. Kegel, V., E. Pfeiffer, B. Burkhardt, J. L. Liu, K. Zeilinger, A. K. Nussler, D. Seehofer & G. Damm (2015) Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human In Vitro Liver Model: An Approach to Study DILI. *Mediators Inflamm*, 2015, 640631.
22. Lalor, P.F., W.K. Lai, S. M. Curbishley, S. Shetty & D. H. Adams (2006) Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J Gastroenterol*, 12, 5429-39.
23. Gerlach, J. C., K. Zeilinger, G. Spatkowski, F. Hentschel, N. Schnoy, S. Kolbeck, R. K. Schindler & P. Neuhaus (2001) Large-scale isolation of sinusoidal endothelial cells from pig and human liver. *J Surg Res*, 100, 39-45.
24. Liu, T., O. E. Guevara, R. R. Warburton, N. S. Hill, M. Gaestel & U. S. Kayyali (2010) Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299, C363-73.
25. March, S., E. E. Hui, G. H. Underhill, S. Khetani & S. N. Bhatia (2009) Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro. *Hepatology*, 50, 920-8.
26. Elvevold, K., B. Smedsrod & I. Martinez (2008) The liver sinusoidal endothelial cell: a cell type of controversial and confusing identity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, G391-400.
27. DeLeve, L. D., X. Wang, M. K. McCuskey & R. S. McCuskey (2006) Rat liver endothelial cells isolated by anti-CD31 immunomagnetic separation lack fenestrae and sieve plates. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 291, G1187-9.
28. Friedman, S. L. (2008) Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev*, 88, 125-72.
29. Yin, C., K. J. Evason, K. Asahina & D. Y. Stainier (2013) Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*, 123, 1902-10.
30. Hellerbrand, C. (2013) Hepatic stellate cells-the pericytes in the liver. *Pflugers Arch*, 465, 775-8.
31. Olsen, A. L., S. A. Bloomer, E. P. Chan, M. D. Gaca, P. C. Georges, B. Sackey, M. Uemura, P. A. Janmey & R. G. Wells (2011) Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 301, G110-8.
32. Gaca, M. D., X. Zhou, R. Issa, K. Kiriella, J. P. Iredale & R. C. Benyon (2003) Basement membrane-like matrix inhibits proliferation and collagen synthesis by activated rat hepatic stellate cells: evidence for matrix-dependent deactivation of stellate cells. *Matrix Biol*, 22, 229-39.
33. Schyschka, L., J. J. Sanchez, Z. Wang, B. Burkhardt, U. Muller-Vieira, K. Zeilinger, A. Bachmann, S. Nadalin, G. Damm & A. K. Nussler (2013) Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Arch Toxicol*, 87, 1581-93.
34. Kostadinova, R., F. Boess, D. Applegate, L. Suter, T. Weiser, T. Singer, B. Naughton & A. Roth (2013) A long-term three dimensional liver co-culture system for improved prediction of clinically relevant drug-induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 268, 1-16.
35. Pfeiffer, E., V. Kegel, K. Zeilinger, J. G. Hengstler, A. K. Nussler, D. Seehofer & G. Damm (2015) Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 240, 645-56.
36. Werner, M., S. Driftmann, K. Kleinherr, G. M. Kaiser, Z. Mathe, J. W. Treckmann, A. Paul, K. Skibbe, J. Timm, A. Canbay, G. Gerken, J. F. Schlaak & R. Broering (2015) All-In-One: Advanced preparation of Human Parenchymal and Non-Parenchymal Liver Cells. *PLoS One*, 10, e0138655.

Pfeiffer, E., V. Kegel, K. Zeilinger, J. G. Hengstler, A. K. Nussler, D. Seehofer & G. Damm (2015) Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 240, 645-56.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1535370214558025>

Kegel, V., D. Deharde, E. Pfeiffer, K. Zeilinger, D. Seehofer & G. Damm (2016)  
Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major  
Populations of Non-parenchymal Liver Cells. *J Vis Exp*.

URL: <http://www.jove.com/video/53069>

DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/53069>

Kegel, V., E. Pfeiffer, B. Burkhardt, J. L. Liu, K. Zeilinger, A. K. Nussler, D. Seehofer & G. Damm (2015) Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human In Vitro Liver Model: An Approach to Study DILI. *Mediators Inflamm*, 2015, 640631.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/640631>

## **Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Elisa Pfeiffer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „ Isolierung, Charakterisierung und Kultivierung humaner Hepatozyten und nicht-parenchymaler Leberzellen für pharmakologische Untersuchungen“ 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 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 den ausgewählten Publikationen 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 den erfolgten Publikationen**

Frau Elisa Pfeiffer hatte folgende Anteile an den folgenden Publikationen:

**Publikation 1:** Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, Hengstler JG, Nüssler AK, Seehofer D, Damm G. *Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2015. 240(5): p. 645-56.

75 Prozent

- Entwicklung und Etablierung des Isolierungsprotokolls zur parallelen Isolierung humaner PHH und NPC, Separation der NPC Fraktionen
- Isolierung, Aufreinigung und Kultivierung der Leberzellpopulationen
- Entwicklung, Etablierung und Umsetzung der Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung der NPC
- Evaluierung und Analyse der experimentellen Daten
- Erstellen der Graphiken und Tabellen
- Schreiben und Einreichen des Papers

**Publikation 2:** Kegel V, Deharde D, Pfeiffer E, Zeilinger K, Seehofer D, Damm G. *Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells*. J Vis Exp, 2016 (109).

25 Prozent

- Entwicklung und Etablierung des Isolierungsprotokolls zur parallelen Isolierung humaner PHH und NPC, Separation der NPC Fraktionen
- Isolierung und Identifizierung der Leberzellen
- Überarbeitung und Korrekturlesen des Manuskripts

**Publikation 3:** Kegel V, Pfeiffer E, Britta Burkhardt, Jia Li Liu, Zeilinger K, Nüssler AK, Seehofer D, Damm G. *Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human In Vitro Liver Model: An Approach to Study DILI.* Mediators Inflamm, 2015. 2015: p. 640631.

20 Prozent

- Isolierung primärer humaner Hepatozyten und Kupffer Zellen aus Leberresektaten, Aufreinigung und Kultivierung der Zellpopulationen, Betreuung Leberzellkultur
- Messung Viabilität und Aktivierungslevel der KC
- Überarbeitung und Korrekturlesen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

## **Lebenslauf**

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

## Publikationsliste

1. Kegel V, Deharde D, Pfeiffer E, Zeilinger K, Seehofer D, Damm G.  
*Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells.* J Vis Exp, 2016 (109).  
Impact factor: 1,23 \*
2. Kegel V, Pfeiffer E, Britta Burkhardt, Jia Li Liu, Zeilinger K, Nüssler AK, Seehofer D, Damm G. *Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human In Vitro Liver Model: An Approach to Study DILI.* Mediators Inflamm, 2015. 2015: p. 640631. Impact factor: 3,23\*
3. Pfeiffer E, Kegel V, Zeilinger K, Hengstler JG, Nüssler AK, Seehofer D, Damm G. *Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells.* Exp Biol Med (Maywood), 2015. 240(5): p. 645-56. Impact factor: 2,17\*
4. Damm G, Pfeiffer E, Burkhardt B, Vermehren J, Nüssler AK, Weiss TS. *Human parenchymal and non-parenchymal liver cell isolation, culture and characterization.* Hepatol Int, 2013. 7(4): p. 951-8. Impact factor: 2,47

\* Impactfaktoren 2014

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Igor M. Sauer und Dr. Nathanael Raschzock für die große Unterstützung bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei meiner Arbeitsgruppe, insbesondere bei Dr. Georg Damm, Prof. Dr. Daniel Seehofer, Viktoria Kegel und Anja Schirmeier. Danke schön an Prof. Dr. Jan G. Hengstler, Dr. Katrin Zeilinger, Dr. Andreas K. Nüssler und Stefan Felgner.

Vielen Herzlichen Dank!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde.