

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie, Charité –  
Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum und dem Institut für Tierpa-  
thologie, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin

---

# **Hepatozyten und hepatische Progenitorzellen**

## **— Isolierung und Charakterisierung aus humanem, explantiertem Lebergewebe mit dem Ziel der Zelltransplantation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Sascha Elisa Belaschk**  
Tierärztin aus Berlin

**Berlin 2016**

Journal-Nr.: 3879

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.(Cornell Univ.)  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Igor M. Sauer  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Ralf Einspanier

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

liver cells, liver transplant, cirrhosis, liver regeneration, tolerance, stem cells, isolation techniques, cell cultures, cold storage, mice, animal models, hepatectomy

Tag der Promotion: 22.09.2016

„The truth is rarely pure and never simple.“

O. Wilde



# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Die Leber des Menschen.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 Ursachen des Leberversagens beim Menschen.....</b>	<b>5</b>
2.2.1 Leberzirrhose.....	5
2.2.2 Virale Hepatitiden .....	6
2.2.3 Hepatozelluläres Karzinom .....	6
2.2.4 Autoimmunbedingte Erkrankungen der Leber .....	6
2.2.5 Akutes Leberversagen .....	7
2.2.6 Weitere Lebererkrankungen .....	8
<b>2.3 Leberregeneration .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Regenerationsmechanismen .....	10
2.3.2 Leberzellvorläufer und ausgewählte Oberflächenmarker .....	11
<b>2.4 Therapie des akuten und chronischen Leberversagens .....</b>	<b>17</b>
2.4.1 Orthotope Lebertransplantation .....	17
2.4.2 Leberersatzverfahren.....	18
2.4.3 Leberzelltransplantation.....	18
<b>2.5 Grenzen und Probleme der aktuellen Therapiemöglichkeiten .....</b>	<b>20</b>
<b>2.6 Konzept des Neohybriden Lebertransplantates (Neo-Hybrid Liver Graft)</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7 Zellisolierung aus humanen Lebern .....</b>	<b>27</b>
2.7.1 Hepatozytenisolierung .....	27
2.7.2 Isolierungsmethoden für Leberzellvorläufer .....	27
<b>2.8 Hepatozytentransplantation im Mausmodell .....</b>	<b>29</b>
2.8.1 Anwendungsbereiche .....	29
2.8.2 Etablierte Modelle .....	29
<b>3 ZENTRALE FRAGESTELLUNG UND ARBEITSHYPOTHESEN.....</b>	<b>33</b>

<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>35</b>
4.1	<b>Herkunft der Lebergewebe</b> .....	<b>35</b>
4.2	<b>Isolierung und Aufreinigung von Hepatozyten</b> .....	<b>36</b>
4.3	<b>Kühlagerung der Hepatozyten für zwei Lagerungsmedien im Vergleich</b> .....	<b>41</b>
4.4	<b>Zellkultur und Zellfunktion</b> .....	<b>43</b>
4.4.1	Aussaat und Kultur der Hepatozyten .....	43
4.4.2	Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe von Enzymaktivitäten.....	43
4.4.3	Bestimmung der metabolischen Aktivität über die Messung der hepatozytenspezifischen Produkte Harnstoff und Albumin.....	44
4.4.4	Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Assay.....	44
4.5	<b>Isolierung und Anreicherung von Leberzellvorläufern</b> .....	<b>46</b>
4.5.1	OptiPrep™ -Dichtegradientenzentrifugation .....	46
4.5.2	Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®).....	47
4.6	<b>Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion</b> .....	<b>49</b>
4.6.1	Die Oberflächenmarker EpCAM und CD45 .....	49
4.6.2	Die Oberflächenmarker CD90, CD133/1, CD56 und CD54 .....	50
4.7	<b>Tiermodell</b> .....	<b>51</b>
4.7.1	Verwendete Tiere .....	51
4.7.2	Vorbehandlung der Tiere .....	51
4.7.3	Präparation der zu transplantierenden Hepatozyten und Leberzellvorläufer .	52
4.7.4	Narkose und Operationstechnik.....	53
4.7.5	Postoperativer Verlauf .....	54
4.8	<b>Nachweis der Repopularisierung</b> .....	<b>56</b>
4.8.1	Nachweis des humanen Serumalbumins im Mäuseserum .....	56
4.8.2	Immunhistologische Untersuchung der Mausleber auf humanes Albumin.....	56
4.8.3	Molekularbiologische Untersuchung der Mausleber auf humanes und murines Albumin sowie humanspezifische Alu-Sequenzen .....	58
4.9	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>61</b>
4.10	<b>Beteiligte Personen</b> .....	<b>63</b>

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>65</b>
5.1	<b>Hepatozytenisolierung aus explantierten Lebern und Leberteileresektaten</b> .....	<b>65</b>
5.2	<b>Hepatozytenkultur und Bestimmung der metabolischen Aktivität</b> .....	<b>70</b>
5.2.1	Enzymaktivitäten und Stoffwechselprodukte im Mediumüberstand .....	71
5.2.2	Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin Assay.....	73
5.3	<b>Ergebnisse des <i>Cold Storage</i> Versuches</b> .....	<b>74</b>
5.3.1	Viabilität und relativer Zellzahlverlust der Hepatozyten nach Kühlung ..	74
5.3.2	Zellkultur der Hepatozyten aus explantierten Lebern nach Kühlung.....	77
5.4	<b>Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion vor den Anreicherungsverfahren</b> .....	<b>78</b>
5.4.1	Die Oberflächenmarker EpCAM und CD45 .....	78
5.4.2	Die Oberflächenmarker CD90, CD133/1, CD54 und CD56 .....	78
5.4.3	Die Zellfraktion EpCAM+/CD45-.....	79
5.4.4	Die Zellfraktion EpCAM-/CD45-.....	79
5.4.5	Die Zellfraktion EpCAM-/CD45+.....	80
5.5	<b>Ergebnisse der Anreicherung potentieller Leberzellvorläufer mit zwei verschiedenen Verfahren</b> .....	<b>81</b>
5.5.1	Ermittlung der Anreicherungseffizienz der OptiPrep™ - Dichtegradientenzentrifugation für EpCAM-positive Zellen .....	81
5.5.2	Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion nach der OptiPrep™ - Dichtegradientenzentrifugation .....	82
5.5.3	Anreicherung mittels Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®) für EpCAM- positive Zellen .....	83
5.6	<b>Einfluss der Monocrotalin-Vorbehandlung immundefizienter Mäuse auf die Repopularisierung der Mausleber</b> .....	<b>84</b>
5.6.1	Durchgeführte Zelltransplantationen .....	84
5.6.2	Analyse des Mausserums auf humanes Serumalbumin .....	86
5.6.3	Nachweis der Repopularisierung: immunhistochemische Färbung .....	86
5.6.4	Nachweis der Repopularisierung: molekulargenetische Untersuchungen .....	87
5.6.5	Voraussetzungen für eine erfolgreiche Repopularisierung .....	88

<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>6.1</b>	<b>Hepatozyten aus explantierten Lebern – Isolierung, Zellkultur und Lagerung.....</b>	<b>89</b>
6.1.1	Beurteilung der Zellisolierung und Zellkultur .....	89
6.1.2	Beurteilung der Lagerung von Hepatozyten aus explantierten Lebern .....	91
6.1.3	Eignung von aus explantierten Lebern isolierter Hepatozyten für die Zelltransplantation .....	92
<b>6.2</b>	<b>Bewertung der Isolierung von Leberzellvorläufern aus explantierten Lebern .....</b>	<b>95</b>
<b>6.3</b>	<b>Bewertung der Anreicherungsverfahren .....</b>	<b>98</b>
6.3.1	OptiPrep™ -Dichtegradientenzentrifugation .....	98
6.3.2	Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®).....	98
<b>6.4</b>	<b>Beurteilung der Ergebnisse des Tiermodells .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN .....</b>	<b>121</b>
10.1	Abbildungsverzeichnis .....	121
10.2	Tabellenverzeichnis .....	122
<b>11</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>123</b>
<b>11.1</b>	<b>Materialliste .....</b>	<b>123</b>
11.1.1	Allgemein verwendete Materialien .....	123
11.1.2	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen für die Zellisolierung .....	129
11.1.3	Allgemein verwendete Puffer und Lösungen für die Analytik und das Tiermodell.....	131
<b>11.2</b>	<b>Vorlage des <i>score sheets</i> für die postoperative Überwachung .....</b>	<b>133</b>
<b>11.3</b>	<b>Finanzierung des Projektes .....</b>	<b>135</b>
<b>12</b>	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>137</b>
<b>13</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>139</b>
<b>14</b>	<b>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....</b>	<b>141</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AFP	<b>Alpha-1-Fetoprotein</b>
AIH	<b>Autoimmune Hepatitis</b>
ALV	<b>Akutes Leberversagen</b>
ALT	<b>Alanin-Aminotransferase</b>
AluS	<b>Alu-Sequenzen</b> (humanspezifische DNA-Sequenzen)
APC	<b>Allophycocyanin</b>
AST	<b>Aspartat-Aminotransferase</b>
CD	engl. <b>Cluster of Differentiation</b>
CK	engl. <b>Cytokeratin</b>
CP	<b>ChillProtec<sup>®</sup></b>
CP+	<b>ChillProtec<sup>®</sup> plus</b>
CNI	<b>Calcineurininhibitor</b>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <b>Ethylenediaminetetraacetic Acid</b> )
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure (engl. <b>Ethyleneglycoltetraacetic Acid</b> )
ELTR	engl. <b>European Liver Transplant Registry</b>
engl.	englisch, aus dem Englischen
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül (engl. <b>Epithelial Cell Adhesion Molecule</b> )
FBS	<b>Fötales Bovines Serumalbumin</b>
hAlb	<b>Humanes Albumin</b>
HCC	Hepatozelluläres Karzinom (engl. <b>Hepatocellular Carcinoma</b> )
HcTx	Hepatozytentransplantation (engl. <b>Hepatocyte Transplantation</b> )
hHBIs	Humane Hepatoblasten (engl. <b>Human Hepatoblasts</b> )
hHpSCs	Humane hepatische Stammzellen (engl. <b>Human Hepatic Stem Cells</b> )
LcProg	Leberzellvorläufer (engl. <b>Liver Cell Progenitors</b> )
LDH	<b>Lactat-Dehydrogenase</b>
MACS	engl. <b>Magnetic-Activated Cell Sorting</b>
MCT	<b>Monocrotalin</b>
MELD	Verteilungssystem für Spenderlebern in Europa (engl. <b>Model for End stage Liver Disease system</b> )

---

mod. Will E	<b>modifiziertes William's Medium E</b>
MSC	Mesenchymale Stammzellen (engl. <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
NaCl 0,9 %	<b>0,9%</b> ige, sterile <b>Natriumchlorid</b> lösung
NAFLD	Nichtalkoholische Fettlebererkrankung (engl. <i>Non-alcoholic Fatty Liver Disease</i> )
NASH	Nichtalkoholische Fettleberentzündung (engl. <i>Non-alcoholic Steatohepatitis</i> )
NK-Zellen	<b>Natürliche Killerzellen</b>
NPC	Nichtparenchymale Zellfraktion (engl. <i>Non Parenchymal Cells</i> )
NTBC	<b>2-(2-Nitro-4-Trifluoromethyl-Benzoyl)1,3-Cyclohexandion</b>
OLT	<b>Orthotope Lebertransplantation</b>
PBC	Primäre biliäre Zirrhose (engl. <i>Primary Biliary Cirrhosis</i> )
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PH	<b>Partielle Hepatektomie</b>
PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis (engl. <i>Primary Sclerosing Cholangitis</i> )
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
SCID	Schwere kombinierte Immundefizienz (engl. <i>Severe Combined Immunodeficiency</i> )
SD	Standardabweichung (engl. <i>Standard Deviation</i> )
SEM	Standardfehler (engl. <i>Standard Error of the Mean</i> )
TBE	<b>Trypanblau-Exklusionstest</b>
uPA	<b>Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator</b>
UW-Lösung	<b>University of Wisconsin-Lösung</b>

# 1 Einleitung

Die Leber ist ein zentrales Organ im Stoffwechsel des Säugerorganismus. Sie besitzt hochregenerative Fähigkeiten und erholt sich selbst nach schweren Erkrankungen mit ausgeprägtem Gewebsverlust eigenständig. Wird jedoch ein gewisses Ausmaß des Zelluntergangs überschritten oder kommt es zu einer permanenten Noxe, so kann dies zu einem irreversiblen, akuten bzw. chronischen Leberversagen führen. Im Jahr 2013 waren 1534 Personen in Deutschland für eine Lebertransplantation gelistet. Diese gilt derzeit als einzige, kausale Therapie des Leberversagens und wurde im gleichen Jahr 970-mal durchgeführt.

Aus der hohen Differenz dieser beiden Zahlen ergibt sich bereits die maßgebliche Problematik der Lebertransplantation. Ein fortwährender Mangel an geeigneten Spenderorganen führt zu sehr langen Wartezeiten und einer Wartelistenmortalität von 30 % und mehr in einzelnen Transplantationszentren (Kornberg, Matevossian et al. 2012). Aus diesem Grund wird intensiv an alternativen Therapien geforscht. Die Hepatozytentransplantation als mögliche Alternative wurde weltweit bereits über 100-mal durchgeführt. Sie gilt jedoch noch lange nicht als standardisierte Therapieform. Auch hier besteht ein elementarer Mangel an Spenderorganen, da sie mit der Lebertransplantation als etablierte Therapieform um diese Organe konkurriert. Aktuell wird daher versucht, andere Zellquellen wie z. B. kultivierbare Leberzellvorläufer oder Stammzellen aus anderen Geweben zu etablieren.

Ein weiteres, wesentliches Problem bei der Lebertransplantation besteht in den Langzeitkomplikationen, die vor allem durch die langfristige Gabe von Immunsuppressiva ausgelöst werden. Neben den typischen kortikosteroidalen Nebenwirkungen wie Anfälligkeit für Infektionen, Hypertonie und *de novo* Diabetes mellitus, kommt es bei vielen Patienten zum chronischen Nierenversagen, so dass eine Nierentransplantation notwendig werden kann.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines größeren Projektes, welches die beiden Therapieformen Lebertransplantation und Leberzelltransplantation miteinander verbinden soll. Das Konzept des Neohybriden Lebertransplantates sieht eine Zelltransplantation von Hepatozyten vor, die aus Lebern gewonnen wurden, welche im Rahmen einer Lebertransplantation explantiert wurden. In der Vergangenheit wurden bereits vereinzelt erfolgreich Leberzellen aus diesen stark geschädigten Organen isoliert. In der vorliegenden Arbeit soll nun geprüft werden, ob eine routinemäßige Isolierung qualitativ hochwertiger Hepatozyten und Leberzellvorläufer aus diesen Lebern möglich ist. Zudem sollen Unterschiede der Isolierungsergebnisse sowie der Zusammensetzung der isolierten Leberzellvorläufer zwischen den verschiedenen ursächlichen Erkrankungen aufgezeigt werden.

Hierfür wurden Hepatozyten und Leberzellvorläufer aus hochgradig erkranktem und aus unverändertem Lebergewebe isoliert. Die Hepatozyten wurden vergleichend in Kultur auf

ihre Viabilität und metabolische Aktivität getestet und zudem einer Kühlung über bis zu 48 Stunden unterzogen. Die Nichtparenchymale Zellfraktion wurde mittels Durchflusszytometrie charakterisiert und auf zwei Anreicherungsverfahren für Leberzellvorläufer getestet.

Ein weiterer Teil des Projektes sieht die Zelltransplantation der aus explantierter, humaner Leber gewonnenen Hepatozyten im Mausmodell vor. Bereits etablierte Mausmodelle der aktuellen Literatur waren jedoch nicht geeignet, da sie nicht berücksichtigen, dass die Lebertransplantation beim Menschen in der Regel nicht planbar ist sondern je nach Vorliegen einer Spenderleber kurzfristig durchgeführt wird. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein neuartiges Mausmodell entwickelt und getestet.

Ziel des übergeordneten Projektes des Neohybriden Lebertransplantates ist es, über ein *in vivo* Tissue-Engineering eine partielle oder komplette operationale Toleranz gegenüber der Spenderleber zu erreichen. Auf diese Weise könnte die immunsuppressive Therapie gesenkt bzw. vollständig ausgesetzt und deren Nebenwirkungen somit deutlich reduziert werden.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die Leber des Menschen

Die Leber ist eines der größten Organe des menschlichen Körpers und das zentrale Stoffwechselorgan des gesamten Organismus. Sie übernimmt vielfältige Aufgaben wie die Verwertung aufgenommener Nährstoffe, Synthese der meisten Plasmaproteine, Metabolisierung von Endo- und Xenobiotika sowie Gallensäuresynthese und Gallebildung. Sie wirkt zudem bei der Immunabwehr mit und übernimmt die Bildung, Speicherung und Prozessierung von Signalmolekülen (Häussinger and Löffler 2007).

Die Leber des Menschen wird in einen großen rechten und einen kleinen linken Leberlappen eingeteilt. Diese sind durch das Ligamentum falciforme hepatis und das Ligamentum venosum getrennt. Die Leber liegt intraperitoneal dem Zwerchfell und der rechten Bauchwand an und wird gemäß ihrer Gefäßversorgung in neun Segmente unterteilt, die mit der äußerlich sichtbaren Lappung nicht identisch sind (Drenckhahn and Fahimi 2008).

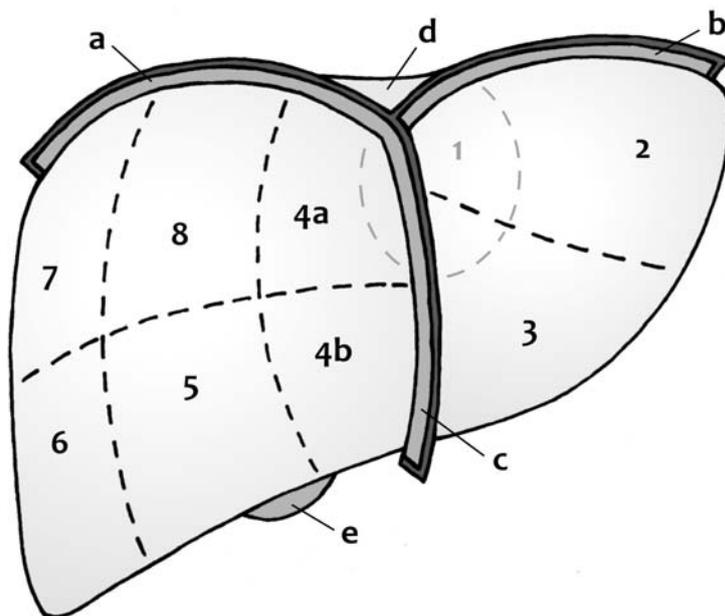


Abb. 2-1:

#### Gliederung der Leber des Menschen in neun Segmente

In Anlehnung an:

(Henne-Bruns 2003)

a: *Ligamentum coronarium hepatis*;

b: *Ligamentum triangulare sinister*;

c: *Ligamentum falciforme hepatis*;

d: *Area nuda*; e: *Vesica biliaris*

Auf histologischer Ebene wird das Leberparenchym in Läppchen eingeteilt, welche im Zentrum die Endaufzweigungen der Lebervenen, die Zentralvenen, enthalten. Am Rand der Läppchen befinden sich die Portalkanäle. In ihnen verlaufen interlobuläre Gallengänge sowie die Endaufzweigungen der Portalvene und der Arteria hepatica. Diese 3 Strukturen bilden zusammen die GLISSONsche Trias. Von den Endästen der Portalvene ausgehend ziehen die Lebersinusoide in das Läppchen und bilden zwischen ihrem fenestrierten Endothel und den Hepatozyten den DISSEschen Raum. Hier befinden sich

die KUPFFER-Zellen und die Stern- oder ITO-Zellen. Die Lebersinusoide eines Läppchens münden in dessen Zentralvene, von wo aus das Blut in Richtung des Herzens abgeleitet wird (Drenckhahn and Fahimi 2008).

An ihren aneinander grenzenden Seiten bilden die Hepatozyten etwa 1 – 2 µm breite Kanälchen, die mit Mikrovilli ausgekleidet sind und den Anfang des Galleflusses darstellen. Die Kanälchen ziehen an den Rand des Läppchens und vereinen sich dort zu größeren Kanälen, welche partiell mit Cholangiozyten ausgekleidet sind (Saxena and Theise 2004).

Dieser Teil des galleabführenden Systems wurde erstmals 1867 von Ewald Hering beschrieben und nach ihm als HERING-Kanäle benannt (Hering 1867). Sie stellen das Verbindungsstück zwischen Cholangiozyten und Hepatozyten in der Leber dar und werden heutzutage als Stammzellnischen angesehen, die Vorläufer für sowohl Leber- als auch Gallengangszellen enthalten (Kuwahara, Kofman et al. 2008; Kordes and Haussinger 2013).

Die Lebensspanne eines Hepatozyten beträgt unter normalen Bedingungen 190 – 450 Tage (Macdonald 1961). Der Zellumsatz einer gesunden Leber ist damit gering, im Falle einer Erkrankung besitzt sie jedoch eine ausgesprochen hohe regenerative Kapazität (Michalopoulos 2007).

## 2.2 Ursachen des Leberversagens beim Menschen

Die Ursachen des akuten, subakuten oder chronischen Leberversagens des Menschen sind sehr vielseitig. Sie führen über pathophysiologisch unterschiedliche Wirkmechanismen zur Einschränkung bis hin zum Verlust der Leberfunktion, sodass eine Lebertransplantation erforderlich sein kann.

Im Folgenden werden die häufigsten Ursachen des Leberversagens aufgeführt und kurz erläutert.

### 2.2.1 Leberzirrhose

Die Zirrhose ist eine morphologische Veränderung der Leber, die als Endstadium vieler verschiedener chronischer Lebererkrankungen auftritt. Sie ist definiert als diffuser Prozess der Leber, der durch Fibrose und Umwandlung der normalen Leberstruktur in strukturell abnorme Knoten gekennzeichnet ist (Anthony, Ishak et al. 1977; Crawford 2002). Zusätzlich kommt es zu einer Veränderung des hepatischen Blutflusses und somit zu portalem Hochdruck und dessen Folgeerkrankungen. Im histologischen Bild wird die Leberzirrhose durch mit fibrotischen Septen durchzogenes Leberparenchym und dem Auftreten von Hepatozyteninseln ohne Zentralvene charakterisiert (Schuppan and Afdhal 2008).

Die häufigsten Ursachen der Leberzirrhose sind in Deutschland die Alkoholische- und Nichtalkoholische Steatohepatitis sowie Hepatitis B und C (Wiegand and Berg 2013). Weitere mögliche Ursachen sind autoimmunbedingte Erkrankungen, chronische Gallengangserkrankungen, kardiovaskuläre Ursachen, angeborene metabolische Defekte sowie sehr selten auch hepatotoxische Medikamente (Crawford 2002; Wiegand and Berg 2013).

Leberzirrhose ist die mit Abstand häufigste Ursache des Leberversagens in Europa. Sie war die Grunderkrankung bei 53 % aller im Raum des Europäischen Lebertransplantationsregisters (engl. *european liver transplant registry*, ELTR) stattgefundenen Lebertransplantationen zwischen 1999 und 2009. Die überwiegende Mehrheit bildeten dabei die Alkoholinduzierte Leberzirrhose (20 %) und die Leberzirrhose als Folge von Hepatitis C (15 %) (Adam and Hoti 2009; Adam, Karam et al. 2012).

In Deutschland war die Alkoholische Leberkrankheit 2013 mit 26,4 % der zweithäufigste Grund einer Neuregistrierung auf der Warteliste für Lebertransplantationen (Dunkel and Waage 2013).

### 2.2.2 Virale Hepatitiden

Virale Erkrankungen der Leber werden grundsätzlich in Infektionen mit hepatotropen- und nichthepatotropen Erregern unterteilt. Dabei sind die hepatotropen Viren der Hepatitis B und C in der Transplantationsmedizin an erster Stelle zu nennen. Beide Erkrankungen verlaufen im akuten Stadium oft subklinisch und führen nur in extrem seltenen Fällen zu akutem Leberversagen. Die chronische Verlaufsform ist prognostisch jedoch bedeutend schlechter, da sie in 20 – 30 % der Fälle schleichend zu einer Zirrhose fortschreitet. Hierbei weist Hepatitis C mit 60 – 80 % eine deutlich höhere Chronifizierungsrate auf als Hepatitis B mit nur etwa 10 % der erwachsenen Infizierten (Dancygier, Frühauf et al. 2003). Beide Erreger gelten zudem neben der Zirrhose an sich als grundlegende Faktoren bei der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms (Dancygier 2003). Im Raum des ELTR wurden 23 % aller Lebertransplantationen der Jahre 1999 bis 2009 auf Grund einer viral induzierten Zirrhose durchgeführt (Adam, Karam et al. 2012).

### 2.2.3 Hepatozelluläres Karzinom

Das Hepatozelluläre Karzinom (engl. *hepatocellular carcinoma*, HCC) ist ein maligner, von Stammzellen der Hepatozyten ausgehender, epithelialer Tumor. Es sind zahlreiche Faktoren bekannt, die mit einem erhöhten Risiko einer HCC-Entstehung einhergehen (Dancygier 2003). Etwa 80 – 90 % dieser Tumoren gehen aus einer zirrhotischen Leber hervor, wobei das Risiko an einem HCC zu erkranken, zudem stark von der ursächlichen Erkrankung der Zirrhose abhängig ist (El-Serag 2011; Wiegand and Berg 2013). Das HCC-Risiko ist hoch bei viralen Hepatitiden (15 % in endemischen Regionen mit Hepatitis B) und vergleichsweise niedrig bei Alkoholischer Zirrhose (8 %) und Gallengangserkrankungen (4 %) (Schuppan and Afdhal 2008). Die Lebertransplantation gilt bei Patienten mit HCC als die Therapie mit der geringsten Rezidivrate, da gleichzeitig die Zirrhose als größter Risikofaktor für die Entstehung neuer Tumore behandelt wird (El-Serag 2011). In Europa fanden zwischen 1999 und 2009 etwa 14 % aller Lebertransplantationen infolge einer HCC-Erkrankung statt (Adam, Karam et al. 2012).

### 2.2.4 Autoimmunbedingte Erkrankungen der Leber

Unter autoimmunbedingten Erkrankungen der Leber, welche ein Leberversagen hervorrufen können, werden die Primäre Sklerosierende Cholangitis (engl. *primary sclerosing cholangitis*, PSC), Primäre Biliäre Zirrhose (engl. *primary biliary cirrhosis*, PBC) und Autoimmunhepatitis (engl. *autoimmune hepatitis*, AIH) zusammengefasst.

Die PSC ist eine fortschreitende, chronische Erkrankung der Gallengänge, die mit Entzündung, periportal Fibrose und Cholestase einhergeht (Hirschfield, Karlsen et al. 2013). Sie ist klar assoziiert mit einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (engl. *inflammatory bowel disease*, IBD), welche bei etwa zwei Drittel der an PSC erkrankten Menschen auftritt (Boonstra, van Erpecum et al. 2012). Die Inzidenzraten weltweit sind sehr variabel und liegen zwischen 0 und 1,3 pro 100 000 Einwohner/Jahr (Boonstra, Beuers et al. 2012). Mehr als die Hälfte der erkrankten Personen benötigen innerhalb von 10 – 15 Jahren nach dem Auftreten der ersten Symptome eine Lebertransplantation (Hirschfield, Karlsen et al. 2013).

Die PBC ist eine autoimmune Erkrankung der intrahepatischen Gallengänge, die durch das Vorkommen hochspezifischer, antimitochondrialer Antikörper im Serum gekennzeichnet ist (Selmi, Bowlus et al. 2011). Auch hier kommt es zu chronischer Cholestase sowie periportal Entzündung und Fibrose der Gallengänge, die im schlimmsten Fall eine Lebertransplantation notwendig machen (Ilyas, O'Mahony et al. 2011). Die Zahl der Lebertransplantationen infolge einer PBC ist in den letzten zwei Jahrzehnten jedoch gesunken, da viele Patienten gut auf eine Therapie mit Ursodesoxycholsäure ansprechen (Lee, Belanger et al. 2007; Ilyas, O'Mahony et al. 2011). Etwa 10 % aller Lebertransplantationen in Europa zwischen 1999 und 2009 wurden auf Grund einer PSC oder PBC durchgeführt (Adam, Karam et al. 2012).

Die AIH ist eine entzündliche Erkrankung des Leberparenchyms, die in akuter und chronischer Form vorkommt (Ilyas, O'Mahony et al. 2011). Es wird von einer multifaktoriellen Ätiologie ausgegangen, bei der verschiedene Umweltfaktoren die Erkrankung bei genetisch prädisponierten Personen auslösen können. Zusätzlich spielt die Autoreaktivität gegen körpereigene Antigene der Leber eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der AIH (Heneghan, Yeoman et al. 2013). Die Inzidenzrate in Europa erreicht 1,07 bis 1,9 pro 100 000 Einwohner/Jahr (Boberg, Aadland et al. 1998; Primo, Maroto et al. 2009). Die Mehrzahl der Erkrankten spricht gut auf eine immunsuppressive Therapie an, so dass nur selten eine Lebertransplantation notwendig wird (Jungst, Lammert et al. 2013).

### 2.2.5 Akutes Leberversagen

Unter Akutem Leberversagen (ALV) versteht man eine hochgradige Einschränkung der Leberfunktion, die mit einer Koagulopathie und einer hepatischen Enzephalopathie ohne vorbestehende Lebererkrankung einhergeht (Bischof, Ito-Jung et al. 2013). Je nach Zeitpunkt des Auftretens der Enzephalopathie wird zwischen hyperakut, akut und subakut unterschieden, wobei der längste Zeitraum 26 Wochen nicht überschreitet (Bernal and

Wendon 2013; Bischof, Ito-Jung et al. 2013). Weltweit gelten virale Hepatitiden als häufigste Ursache für ALV. In den USA und größeren Teilen Europas sind diese jedoch weniger weit verbreitet, so dass ALV hier häufiger medikamentös-toxisch, z. B. durch Paracetamol, ausgelöst wird (Bernal and Wendon 2013; Whitehouse and Wendon 2013). Weitere mögliche Ursachen sind vaskulär bedingte Leberschäden (z. B. Ischämische Hepatitis, Budd-Chiari-Syndrom), metabolische Erkrankungen (z. B. Morbus Wilson, Akute Fettleberhepatitis in der Schwangerschaft), Autoimmunhepatitis und neoplastische Infiltrationen (Whitehouse and Wendon 2013). Im Raum des ELTR wurden 7 % der Lebertransplantationen zwischen 1999 und 2009 auf Grund eines ALV durchgeführt (Adam, Karam et al. 2012).

### 2.2.6 Weitere Lebererkrankungen

Weitere, jedoch seltenere Ursachen für das Leberversagen des Menschen sind angeborene Defekte der Leber und das Budd-Chiari-Syndrom. Die Nichtalkoholische Fettleberentzündung ist eine Erkrankung mit zunehmender Bedeutung, auch in der Transplantationsmedizin.

Unter der Bezeichnung ‚angeborene Leberdefekte‘ wird eine Vielzahl an Erkrankungen zusammengefasst, deren Ursache direkt in der Leber begründet ist oder die zu einem chronischen Leberschaden führen. Beispiele hierfür sind Morbus Wilson, Hämochromatose, Alpha-1-Antitrypsin-Mangel, Harnstoffzyklusdefekte und andere Speicherkrankheiten (Pascher, Nebrig et al. 2013).

Auch die Polyzystische Lebererkrankung, die im Rahmen einer Polyzystischen Nierenerkrankung oder sehr selten auch isoliert auftritt, kann eine Lebertransplantation notwendig machen (van Keimpema, Nevens et al. 2011). Insgesamt beträgt die Häufigkeit von Lebertransplantationen auf Grund angeborener Leberdefekte unter 5 % (Pascher, Nebrig et al. 2013).

Das Budd-Chiari-Syndrom wird durch eine Obstruktion der abführenden Gefäße der Leber charakterisiert. Die vorherrschende, primäre Form ist als ein direkter venöser Schaden, der meist durch Thrombosen verursacht wird, definiert. Die seltenere, sekundäre Form wird durch eine extrinsische Kompression der Venen (z. B. durch Abszesse, Tumoren oder Zysten) ausgelöst (Aydinli and Bayraktar 2007). Das klinische Erscheinungsbild reicht von asymptomatisch bis hin zu fulminantem Leberversagen. Am häufigsten tritt die chronische Form auf, die durch portale Hypertension und daraus resultierender Leberzirrhose geprägt ist (Ferral, Behrens et al. 2012). Mit einer geschätzten Prävalenzrate weltweit von etwa 1 auf 100 000 Personen ist das Budd-Chiari-Syndrom

eine seltene Erkrankung (Valla 2009; Ferral, Behrens et al. 2012). Im Raum des ELTR wurden zwischen 1988 und 2012 weniger als 1 % der Lebertransplantationen auf Grund eines Budd-Chiari-Syndroms durchgeführt (ELTR 2014).

Die Nichtalkoholische Fettleberentzündung (engl. *nonalcoholic steatohepatitis*, NASH) ist eine direkte Folge der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung (engl. *nonalcoholic fatty liver disease*, NAFLD). Mit einer Prävalenz von 15 – 30 % ist die NAFLD die häufigste Lebererkrankung der westlichen Welt (Schwenger and Allard 2014). Sie wird mit Übergewicht und dem Metabolischen Syndrom assoziiert (Marchesini, Bugianesi et al. 2003). Etwa 10 – 20 % der Betroffenen weisen zusätzlich entzündliche Veränderungen der Leber auf, die NASH. Die NASH gilt als potentieller Risikofaktor für die Entwicklung einer Leberzirrhose mit ihren Folgeerkrankungen, einschließlich einem möglichen Leberversagen (Tilg and Moschen 2010; Ganz and Szabo 2013; Schwenger and Allard 2014). In den USA hat sich die Zahl der Lebertransplantationen auf Grund einer NASH in den letzten 10 Jahren verfünffacht (Agopian, Kaldas et al. 2012). In der Statistik des ELTR taucht diese Erkrankung nicht gesondert auf (Adam, Karam et al. 2012).

## 2.3 Leberregeneration

### 2.3.1 Regenerationsmechanismen

Die Leber ist ein hochregeneratives Organ, das bis zu 70 % Verlust seiner Zellmasse durch Wachstum und Proliferation der verbleibenden Zellen ausgleichen kann. Dabei kommt es auf drei Ebenen zu proliferativen Zellantworten, die mit steigender Dauer und Intensität des Leberschadens nacheinander einsetzen: 1. Zellteilung reifer Hepatozyten, 2. Proliferation bipotenter Leberzellvorläufer aus den HERING-Kanälen, 3. Einwanderung, Proliferation und Differenzierung von Stammzellen aus dem Knochenmark (Craig, Quaglia et al. 2004; Godoy, Hewitt et al. 2013).

Die Zellteilungs- und -regenerationskapazität adulter Hepatozyten wurde zuerst im Rattenmodell nach partieller Hepatektomie erforscht. Nach Entnahme von zwei Drittel des Leber Volumens wiesen alle verbleibenden Hepatozyten innerhalb von 48 Stunden DNA-Synthese auf und teilten sich ein oder zwei Mal, so dass nach fünf bis sieben Tagen die ursprüngliche Lebermasse wieder hergestellt war (Rabes, Wirsching et al. 1976; Alison 1986; Michalopoulos 2007). Diese Teilungsfähigkeit ist nahezu unbegrenzt. Auch nach wiederholter Hepatozytentransplantation im Mausmodell proliferierten die Zellen ohne Funktionseinschränkung und führten dabei mindestens 69 Teilungen je Zelle durch (Overturf, al-Dhalimy et al. 1997). Ähnliche Regenerationsvorgänge werden auch nach Leberteilresektion beim Menschen beobachtet. In einer Studie zur Leberlebendspende wurde das ursprüngliche Lebervolumen der Spender auf ca. 35 % reduziert. Zwölf Monate später wies deren Leber ein Volumen von  $85 \pm 18$  % des ursprünglichen Leber Volumens auf (Pascher, Sauer et al. 2002).

Übersteigt der akute Zellverlust einen kritischen Schwellenwert oder liegt eine anhaltende Schädigung der Hepatozyten vor, kommt es zur Proliferation bipotenter Vorläuferzellen der Leber (engl. *liver cell progenitors*, LcProg). Diese gehen aus den HERING-Kanälen hervor und differenzieren sich über verschiedene Zwischenstufen zu Hepatozyten oder Cholangiozyten (Roskams, Libbrecht et al. 2003; Kordes and Haussinger 2013). Im histologischen Bild zeigt sich dies als duktiläre Reaktion und wird sowohl bei akutem Leberversagen nach massiver hepatozellulärer Nekrose als auch bei chronisch cholestatischen und nichtcholestatischen Lebererkrankungen beobachtet (Roskams, De Vos et al. 1991; De Vos and Desmet 1992; Crosby, Hubscher et al. 1998; Roskams, De Vos et al. 1998; Roskams, Libbrecht et al. 2003). Neben den HERING-Kanälen werden momentan auch andere Bereiche der Leber als potentielle Stammzellnischen diskutiert. Nach einem proliferativen Stimulus wandelten sich im DISSE-Raum vorkommende Stern- oder ITO-Zellen über eine mesenchymale Zwischenphase in albuminproduzierende Hepatozyten um

(Yang, Jung et al. 2008). In anderen Versuchen ließen sich hepatische Sternzellen *in vitro* zu Hepatozytenähnlichen Zellen differenzieren und repopularisierten erfolgreich geschädigte Lebern im Rattenmodell (Kordes, Sawitza et al. 2007; Kordes, Sawitza et al. 2012). Auch aus den extrahepatischen Gallengängen und der Gallenblase konnten LcProg gewonnen werden, die *in vitro* zu Hepatozytenähnlichen Zellen ausdifferenzierten (Kuver, Savard et al. 2007; Cardinale, Wang et al. 2011).

Hämatopoetische Stammzellen, die aus dem Knochenmark einwandern und zu Hepatozyten transdifferenzieren, werden als eine weitere mögliche Quelle für die Regeneration des Leberparenchyms diskutiert (Craig, Quaglia et al. 2004; Kordes and Haussinger 2013). Sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen wurden in der sich regenerierenden Leber Hepatozyten nachgewiesen, die aus dem Knochenmark stammten (Petersen, Bowen et al. 1999; Theise, Nimmakayalu et al. 2000). Andere Versuche zeigten jedoch, dass nicht eine Transdifferenzierung sondern die Fusion der Stammzellen mit den verbliebenen Hepatozyten der dafür verantwortliche Mechanismus war (Vassilopoulos, Wang et al. 2003; Wang, Willenbring et al. 2003). Nach allgemeiner Auffassung geht man heute davon aus, dass die Regeneration der Leber durch hämatopoetische Stammzellen ein sehr seltenes Ereignis ist und ihr daher eine untergeordnete Bedeutung zukommt (Wang, Montini et al. 2002; Michalopoulos 2007; Duncan, Dorrell et al. 2009).

### 2.3.2 Leberzellvorläufer und ausgewählte Oberflächenmarker

Stammzellen sind durch zwei grundlegende Eigenschaften definiert: Sie können sich nahezu unbegrenzt teilen und haben die Fähigkeit, sich in ein oder mehrere unterschiedliche Zelltypen zu entwickeln (Hall 1989; Watt and Hogan 2000). Während embryonale Stammzellen in jegliches Gewebe ausdifferenzieren können, sind adulte Stammzellen auf bestimmte Gewebe begrenzt. Dort kommen sie in sogenannten Stammzellnischen vor und können im aktivierten Zustand sich schnell teilende Progenitor- oder Vorläuferzellen bilden und somit der Regeneration der Gewebe dienen (Watt and Hogan 2000). Die adulten Stammzellen der Leber werden Hepatische Stammzellen (engl. *human hepatic stem cells*, hHpSCs) genannt und kommen in den HERING-Kanälen vor. Im aktivierten Zustand bilden sie Hepatoblasten (engl. *human hepatoblasts*, hHBs), die über mehrere Zwischenstufen zu Hepatozyten oder Cholangiozyten ausdifferenzieren (Roskams, Katoonizadeh et al. 2010; Turner, Lozoya et al. 2011).

Während die LcProg in der fetalen Leber bis zu 20 % der Zellmasse ausmachen und dabei zu 95 % aus hHBs bestehen, lassen sich in der Leber von Kindern und Erwachsenen nur noch geringe Mengen an Vorläuferzellen (1,3 – 2,1 %) nachweisen. Diese setzen sich fast ausschließlich aus hHpSCs (>99 %) zusammen (Schmelzer, Zhang et al. 2007).

Neben gesunden adulten oder fetalen Lebern können auch erkrankte Organe als Zellquelle für LcProg dienen. In mehreren Studien wurden erfolgreich humane LcProg aus stark geschädigten Lebern isoliert, die bei einer Lebertransplantation entnommen worden waren (Crosby, Kelly et al. 2001; Selden, Chalmers et al. 2003; Laurson, Selden et al. 2007). Die Bildung von Kolonien in einer *in vitro*-Zellkultur blieb jedoch ein seltenes Ereignis. Vergleichsstudien mit gesunden adulten oder fetalen Lebern existieren hierbei allerdings nicht.

Tolosa et al. gelang die Isolierung muriner LcProg aus im Rattenmodell induzierter Fettleber (Tolosa, Bonora-Centelles et al. 2011). Auch aus gesunden, humanen Leberteileresektaten, die nach der Entnahme einer 24 bis 48-stündigen Kälteischämie ausgesetzt waren, konnte eine vergleichbare Anzahl LcProg isoliert werden wie aus Resektaten mit minimaler Kälteischämiezeit (Aupet, Simone et al. 2013).

Die Identifizierung und Charakterisierung von LcProg kann auf mehreren Wegen erfolgen. Diese sind:

- der direkte Nachweis von LcProg-spezifischen Markern, die nicht von adulten Hepatozyten exprimiert werden (Beispiele siehe Tab. 2-1),
- der Nachweis eines hepatobiliären Phänotypes, das heißt das Vorkommen von hepatozytenspezifischen- und cholangiozytenspezifischen Markern auf derselben Zelle (Beispiele siehe Tab. 2-1),
- die Fähigkeit *in vitro* Kolonien zu bilden und sich unter entsprechenden Bedingungen in Hepatozyten oder Zellen mit hepatozytenähnlichen Eigenschaften auszudifferenzieren,
- die Fähigkeit *in vivo* eine geschädigte Leber im Tiermodell zu repopularisieren und damit ihre Funktion wiederherzustellen.

(Dolle, Best et al. 2010; Roskams, Katoonizadeh et al. 2010)

Diese Nachweismethoden sind mit unterschiedlich hohem Aufwand verbunden und finden sich in der Literatur je nach Zielstellung der jeweiligen Studien in verschiedenem Umfang wieder.

Zelltyp	Marker	Referenz
LcProg	OV-6  EpCAM, NCAM und CD133  AFP  CD90	(Roskams, De Vos et al. 1998; Russo and Parola 2011)  (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Roskams, Katoonizadeh et al. 2010)  (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Darwiche and Petersen 2010)  (Herrera, Bruno et al. 2006; Weiss, Lichtenauer et al. 2008)
Hepatozyten	CK8, CK18, C-met, Albumin	(Roskams, Katoonizadeh et al. 2010)
Cholangiozyten	CK7, CK19, CK14	(Roskams, Katoonizadeh et al. 2010)

Tab. 2-1: **Übersicht ausgewählter Marker für Leberzellvorläufer (LcProg), Hepatozyten und Cholangiozyten**

EpCAM: Epitheliales Zelladhäsionsmolekül; NCAM: Neuronales Zelladhäsionsmolekül; CD: Cluster of Differentiation; AFP: Alpha-1-Fetoprotein; CK: Zytokeratin

In einem so komplexen Stoffwechselorgan wie der Leber existieren kaum spezifische Marker für Vorläuferzellen, die nicht mit anderen Zellpopulationen geteilt werden (Dolle, Best et al. 2010). Dennoch wird weiterhin intensiv nach solchen Markern gesucht (Ochsner, Strick-Marchand et al. 2007; Schotanus, van den Ingh et al. 2009). Eine zentrale Rolle spielte dabei in den letzten Jahren das Epitheliale Zelladhäsionsmolekül (engl. *epithelial cell adhesion molecule*, EpCAM, CD326), aber auch zahlreiche weitere Marker sind von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht worden (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Aupet, Simone et al. 2013). In der Literatur finden sich dazu eine Reihe umfangreicher Studien und Übersichtsartikel (Schmelzer, Wauthier et al. 2006; Duret, Gerbal-Chaloin et al. 2007; Rao, Khan et al. 2008; Dolle, Best et al. 2010; Turner, Lozoya et al. 2011). Aus der Vielfalt an möglichen Molekülen wurden für diese Arbeit einige Marker ausgewählt, die nachfolgend vorgestellt werden sollen.

Der **Oberflächenmarker EpCAM** ist ein 40 kD großes Glykoprotein, welches auf verschiedenen Epithelzelltypen vorkommt und Zell-Zell-Kontakte vermittelt (Litvinov, Bakker et al. 1994; Litvinov, Velders et al. 1994). Seine verstärkte oder *de novo* Expression wird mit aktiver Proliferation in Verbindung gebracht. So kommt EpCAM unter anderem in hohem Maße bei der Mehrzahl aller Karzinome vor (Balzar, Winter et al. 1999). In der adulten, gesunden Leber wird EpCAM von den Epithelzellen der kleinen Gallengänge

und intralobulären Gallekanälchen exprimiert. Hepatozyten und große Gallengänge sind EpCAM-negativ (de Boer, van Krieken et al. 1999). Bei Lebern mit chronisch proliferativen Erkrankungen sowie in embryonalem Lebergewebe lag eine erhöhte Expression an EpCAM vor, die hier ebenfalls mit aktiver Proliferation assoziiert wurde (de Boer, van Krieken et al. 1999). EpCAM gilt als gemeinsamer Marker für hHpSCs und hHBs und wurde mehrfach auf nichtparenchymalen Zellen der Leber mit den oben genannten Eigenschaften für Vorläuferzellen nachgewiesen (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Yovchev, Grozdanov et al. 2008; Aupet, Simone et al. 2013).

**Thy-1 oder Cluster of Differentiation 90 (CD90)** ist ein Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie, welches auf der Zelloberfläche unterschiedlicher Zelltypen wie zum Beispiel Thymozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Neuronen sowie hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird (Barker and Hagoood 2009). Im Rahmen der Leberregeneration wurde CD90 auf Vorläuferzellen bei lebergeschädigten Ratten (Petersen, Goff et al. 1998) und in humanem, fetalem Lebergewebe nachgewiesen (Masson, Currie et al. 2006). Die Angaben in der Literatur sind jedoch widersprüchlich. Einige Studien ergaben, dass CD90 als Marker für Myofibroblasten und nicht für hepatische Vorläufer agiert (Dezso, Jelnes et al. 2007; Dudas, Mansuroglu et al. 2007; Yovchev, Grozdanov et al. 2008). Andere Arbeitsgruppen wiederum unterstützen weiterhin die Annahme, dass CD90 ein Vorläuferzellmarker in der Leber ist (Herrera, Bruno et al. 2006; Weiss, Lichtenauer et al. 2008). Khuu et al. isolierten aus gesunder humaner Leber CD90-positive epitheliale Zellkolonien, die einen hepatobiliären Phänotyp aufwiesen (Khuu, Najimi et al. 2007). Diese Zellen besaßen zudem die Fähigkeit das Leberparenchym von immundefizienten Mäusen zu repopularisieren.

Das 120 kD große 5-Transmembranprotein **Prominin 1 oder Cluster of Differentiation 133 (CD133)** gehört zur Prominin-Familie (Corbeil, Fargeas et al. 2001). Es befindet sich in der Zellmembran von Vorläuferzellen unterschiedlicher Gewebe, wie zum Beispiel Knochenmark, Gehirn, Niere, Prostata, Leber, Pankreas und Haut. Seine genaue Funktion und Liganden sind jedoch nicht bekannt (Irollo and Pirozzi 2013).

Sowohl in der Ratte als auch beim Menschen wurde CD133 auf Leberzellvorläufern gefunden (Schmelzer, Wauthier et al. 2006; Yovchev, Grozdanov et al. 2007). Tsuchiya et al. zeigten, dass in akut oder chronisch geschädigten, humanen Lebern die vermehrte Expression von CD133 im Rahmen einer dukulären Reaktion auftrat (Tsuchiya, Kamimura et al. 2009). Im Rattenmodell wurden CD133-positive Sternzellen nachgewiesen, die sich unter experimentellen Bedingungen in hepatozytenähnliche Zellen transformieren ließen (Kordes, Sawitzka et al. 2007). Eine andere Gruppe konnte CD133 auf einer Population humaner LcProg jedoch nicht nachweisen (Herrera, Bruno et al. 2006).

Das **Neuronale Zelladhäsionsmolekül** (engl. *neuronal cell adhesion molecule, NCAM, CD56*) ist ein membranständiges Glykoprotein, welches Zell-Zell-Adhäsionen vermittelt und zuerst bei Zellen des Nervensystems nachgewiesen wurde. Es kommt zudem auf vielen nichtneuronalen Zelltypen und Geweben vor. Dazu zählen natürliche Killerzellen (NK-Zellen), neuroendokrine Drüsen, die Leber, das Pankreas und das Kolon (Tsuchiya, Kamimura et al. 2009). In der gesunden adulten Leber ist CD56 weder auf Hepatozyten noch auf Zellen der großen und kleinen Gallengänge oder den HERING-Kanälen zu finden (Van Den Heuvel, Slooff et al. 2001), es wird jedoch von den im DISSE-Raum vorkommenden Sternzellen exprimiert (Nakatani, Seki et al. 1996). Im Rahmen von Regenerationsvorgängen bei akut oder chronisch geschädigten, humanen Lebern wurde CD56 in mehreren Studien auf Zellen der dukulären Reaktion nachgewiesen (Van Den Heuvel, Slooff et al. 2001; Zhou, Rogler et al. 2007; Tsuchiya, Kamimura et al. 2009). Schmelzer et al. nutzten CD56 zur Unterscheidung von hHpSCs und hHBs, die beide EpCAM-positiv waren. Die hHpSCs waren im Gegensatz zu den hHBs zusätzlich CD56-positiv (Schmelzer, Zhang et al. 2007).

Das **Interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1** (engl. *intercellular cell adhesion molecule 1, ICAM-1, CD54*) ist ein zur Immunglobulin-Superfamilie gehörendes Adhäsionsmolekül, das auf Lymphozyten, dendritischen Zellen und aktivierten Endothelzellen vorkommt (Murphy, Travers et al. 2009). In der Leber wird es von sinusoidalen Endothelzellen und in geringem Maße auch von Hepatozyten und Sternzellen exprimiert (van Oosten, van de Bilt et al. 1995; Neubauer, Wilfling et al. 2000). Schmelzer et al. wiesen neben EpCAM auch CD54 auf hHBs nach, hHpSCs dagegen waren CD54-negativ (Schmelzer, Zhang et al. 2007). CD54 wurde daher, genau wie CD56, zur Unterscheidung der beiden Zellpopulationen genutzt (Turner, Lozoya et al. 2011; Aupet, Simone et al. 2013).

In Abb. 2-2 sind die Entwicklungsstadien von LcProg und deren Marker noch einmal schematisch dargestellt.

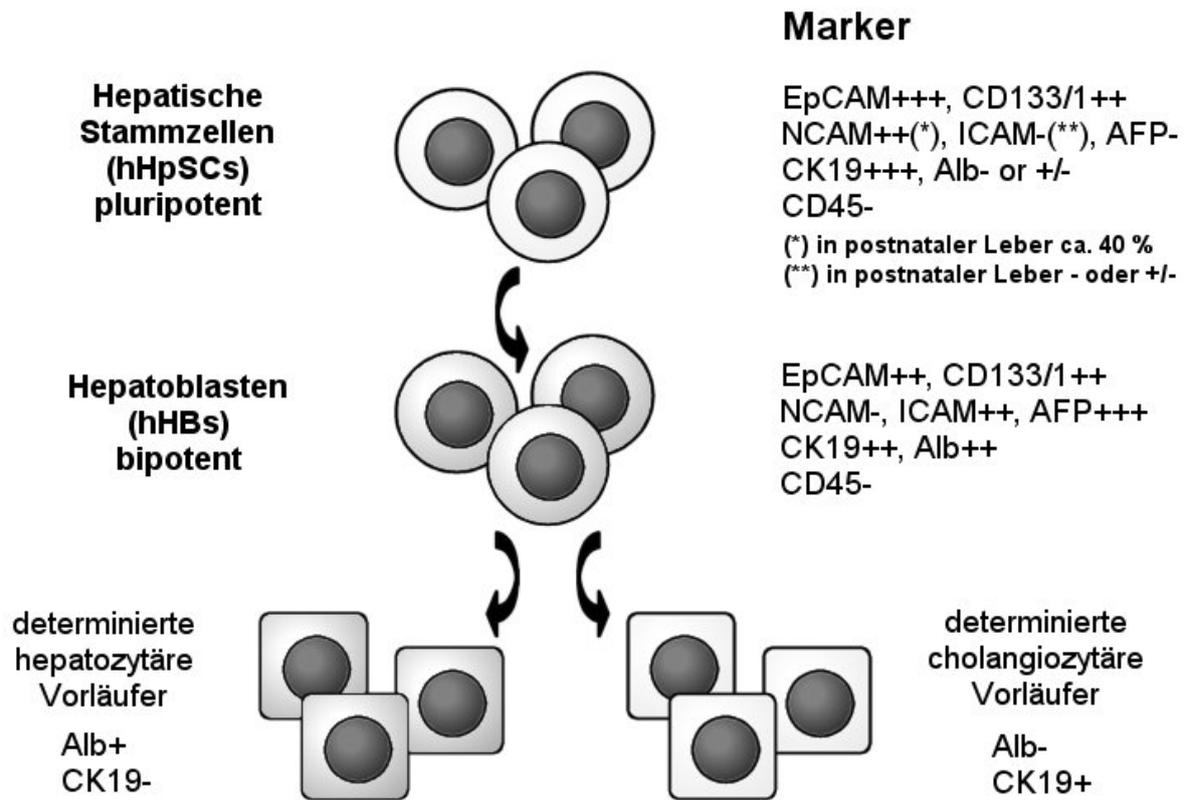


Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von Vorläuferzellen in humaner Leber  
In Anlehnung an: (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Zhang, Theise et al. 2008)

## 2.4 Therapie des akuten und chronischen Leberversagens

### 2.4.1 Orthotope Lebertransplantation

Seit ihren Anfängen in den 60er Jahren hat sich die Orthotope Lebertransplantation (OLT) als gängige Therapieoption in weltweit über 250 Zentren etabliert (Bachir and Larson 2012; ELTR 2014). Sie gilt derzeit als einzige kausale Therapie des irreversiblen, akuten oder chronischen Leberversagens (Bachir and Larson 2012).

Im Raum des ELTR fanden seit 2007 jährlich über 6000 Lebertransplantationen statt (ELTR 2014). Begrenzender Faktor bleibt dabei der relative Mangel an geeigneten Spenderorganen. So wurden 2013 in Deutschland 1305 Personen neu auf der Warteliste für Lebertransplantation registriert, jedoch im gleichen Jahr nur 970 Transplantationen durchgeführt (Dunkel and Waage 2013). Im Jahr 2006 betrug die Wartelistenmortalität im Raum der Eurotransplant 21 %. Durch die Einführung eines geänderten Verteilungssystems (engl. *model for end stage liver disease system*, MELD-System) sowie durch die verstärkte Verwendung von Organen mit gewissen Qualitätsmängeln („extended-criteria organs“) konnte diese im Folgejahr auf 17,9 % gesenkt werden (Rahmel and Osterlee 2007). Gleichzeitig sank jedoch auch die durchschnittliche Überlebensrate der transplantierten Patienten, da das MELD-System schwer erkrankte Personen gegenüber solchen mit prospektiv hohen Überlebensraten nach OLT bevorzugt (Weismuller, Negm et al. 2009).

Durch Verbesserung von Organkonservierung, operativen Techniken und perioperativem Management sowie durch Fortschritte bei der Immunsuppression konnten die Überlebensraten nach OLT seit ihren Anfängen beachtlich gesteigert werden (Pascher, Nebrig et al. 2013; ELTR 2014).

Die Überlebensrate nach OLT ist zudem stark abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. Vergleichsweise hohe Überlebensraten von teilweise über 80 % nach fünf Jahren sind bei OLT auf Grund Alkoholischer Zirrhose oder autoimmunen Erkrankungen zu erwarten (Pfitzmann, Schwenger et al. 2007; Ilyas, O'Mahony et al. 2011). Bei Patienten mit HCV-bedingter Leberzirrhose beträgt die Fünfjahresüberlebensrate nur etwa 70 %, da es in jedem Fall zur Reinfektion und in etwa 20 % der Fälle zu erneuter Leberzirrhose innerhalb weniger Jahre kommt (Forman, Lewis et al. 2002).

Das MELD-System ist ein Punktesystem, mit dem die Schwere einer chronischen Lebererkrankung eingeschätzt werden kann. Es wurde ursprünglich zur Vorhersage von Überlebenszeiten entwickelt und dient heute der Verteilung der zur Verfügung stehenden Spenderorgane (Malinchoc, Kamath et al. 2000; Ravaioli, Grazi et al. 2006). Der *MELD Score* wird in einer Formel aus den Laborwerten des Patienten errechnet und ist zudem vom Ausmaß einer bestehenden Tumorerkrankung abhängig. Er kann ganzzahlige Werte

zwischen 6 und 40 annehmen, wobei höhere Werte für schwerer erkrankte Patienten stehen.

#### 2.4.2 Leberersatzverfahren

Auf Grund ihrer hohen regenerativen Fähigkeiten ist die Leber grundsätzlich in der Lage, sich im Falle eines akuten Leberversagens selbst zu heilen und ihre Funktion spontan wiederherzustellen. Bei Überschreiten eines bestimmten Ausmaßes des Zelluntergangs jedoch führen irreversible Schäden im Organismus zum Tod des Patienten noch bevor eine ausreichende Regeneration des Leberparenchyms erreicht werden kann. An dieser Stelle können Leberersatzverfahren die Aufgaben der Leber im Körper für einen gewissen Zeitraum übernehmen, bis diese ihre Funktion wieder aufnimmt oder eine Lebertransplantation stattfindet (Tritto, Davies et al. 2012).

Grundsätzlich werden zellfreie, artifizielle und zellbasierte, bioartifizielle Verfahren unterschieden. Beide waren in der Lage, die Überlebensrate bei Patienten mit akutem Leberversagen zu verbessern (Stutchfield, Simpson et al. 2011). Der substituierende Effekt der artifiziellen Verfahren ist jedoch begrenzt, da sie nur eine eingeschränkte Entgiftung des Organismus vornehmen und keine der anderen vielfältigen Leberfunktionen wie Proteinsynthese oder Biotransformation ersetzen. Die bioartifiziellen Systeme sind dazu zwar prinzipiell in der Lage, ihr klinischer Einsatz wird jedoch durch einen hohen Aufwand in der Anwendung und die damit verbundenen enormen Kosten begrenzt (Tritto, Davies et al. 2012; Struecker, Raschzok et al. 2014).

#### 2.4.3 Leberzelltransplantation

Eine mögliche Alternative zur OLT bietet die Infusion von Leberzellen (Hepatozytentransplantation, HcTx), die in die vorhandene Leber einwachsen und zum Beispiel angeborene metabolische Defekte ausgleichen. Vorteile hierbei sind die geringere Invasivität und Wiederholbarkeit des Eingriffs. Im Falle eines akuten Leberversagens kann durch HcTx, ähnlich wie bei den Leberersatzverfahren, die Zeit bis zur Transplantation oder der ausreichenden Regeneration des eigenen Lebergewebes überbrückt werden (Hughes, Mitry et al. 2012; Aupet, Simone et al. 2013). Weltweit sind bereits über 35 Fälle beschrieben, bei denen angeborene metabolische Defekte der Leber mittels HcTx behandelt wurden. Dies waren zumeist Kinder, bei denen sich die messbare Leberfunktion über einige Monate bis einige Jahre signifikant verbesserte (Lanzoni, Oikawa et al. 2013). Am Ende stand dennoch oft eine Lebertransplantation, da die transplantierten allogenen Zellen vom Immunsystem abgestoßen wurden (Allen, Mifsud et al. 2008; Han, Lu et al.

2009). Die Behandlung des akuten Leberversagens mit einer HcTx ist bereits in über 40 Fällen beschrieben (Lanzoni, Oikawa et al. 2013). Zwar wurde dabei mehrfach eine Verbesserung der Leberfunktion erreicht, die Überlebensrate konnte jedoch nicht gesteigert werden (Hughes, Mitry et al. 2012). Hier dauerte der positive Effekt sogar nur einige Tage bis einige Wochen an (Lanzoni, Oikawa et al. 2013). Auch bei Patienten mit chronischem Leberversagen wurde die HcTx angewendet, brachte allerdings unterschiedliche Resultate ein (Hughes, Mitry et al. 2012).

Die zu transplantierenden Zellen stammten in der Regel aus den für die OLT abgelehnten Lebern oder Leberteilen. Die Verfügbarkeit dieser Organe ist sehr begrenzt, was noch immer den größten limitierenden Faktor der HcTx darstellt (Hughes, Mitry et al. 2012). Es wird daher intensiv an alternativen Zellquellen geforscht.

Große Aufmerksamkeit wird hierbei dem Feld gewidmet, für die Transplantation geeignete Zellen aus LcProg oder aus Stammzellen anderer Gewebe zu gewinnen. Die einzigen klinischen Studien zur Transplantation von LcProg wurden bislang am Leberinstitut in Hyderabad in Indien durchgeführt (Lanzoni, Oikawa et al. 2013). Mit Hilfe des Markers EpCAM angereicherte LcProg aus fetalen Lebern wurden Kindern mit angeborenen Leberdefekten und Patienten mit Leberzirrhose unterschiedlicher Ätiologie infundiert. In beiden Gruppen führte dies zu einer messbaren Verbesserung der Leberfunktion sowie einem Rückgang der Symptome des chronischen Leberversagens in der Zirrhose-Gruppe. Die Erfolge traten jeweils nach etwa 1 – 3 Monaten auf. Es gibt jedoch noch keine Langzeitresultate, die über sechs Monate nach Zelltransplantation hinausreichen (Khan, Parveen et al. 2008a; Khan, Parveen et al. 2008b; Khan, Shaik et al. 2010).

Die Transplantation von mesenchymalen oder hämatopoetischen Stammzellen zur Behandlung eines chronischen Leberversagens wurde bislang in über 20 klinischen Studien veröffentlicht. In allen Fällen konnten Leberfunktion und Lebensqualität signifikant verbessert werden. Der positive Effekt setzte bereits nach ein paar Tagen bis Wochen ein, hielt aber nie länger als ein paar Monate an. Er wurde daher eher trophischen und immunmodulatorischen Faktoren als einer Repopulation der Leber zugeschrieben (Lanzoni, Oikawa et al. 2013).

## 2.5 Grenzen und Probleme der aktuellen Therapiemöglichkeiten

Die OLT ist mittlerweile eine etablierte Therapieform, deren operative Techniken, präoperative Aufarbeitung der Patienten und ihre postoperative Versorgung standardisiert wurden. Die Kurzzeitüberlebensraten bis ein Jahr nach Transplantation konnten auf diese Weise auf bis zu 80 – 90 % erhöht werden (Pascher, Nebrig et al. 2013). Zudem tritt der Verlust des Transplantates auf Grund einer Abstoßungsreaktion inzwischen nur noch sehr selten auf. Damit rücken Langzeitkomplikationen, die vor allem durch die langfristige Gabe von Immunsuppressiva ausgelöst werden, in den Fokus der postoperativen Betreuung (Liu, Hu et al. 2013; Otto 2013).

Die immunsuppressiven Protokolle nach OLT variieren innerhalb der jeweiligen Transplantationszentren. Sie basieren jedoch grundsätzlich auf einem Calcineurininhibitor (CNI) wie Cyclosporin A oder Tacrolimus, der mit weiteren Präparaten kombiniert wird. Dies sind in der Regel Kortikosteroide und der Antimetabolit Mycophenolat-Mofetil (Wiesner and Fung 2011).

Alternativ werden in der Induktionsphase bei einigen Patienten antilymphozytäre Antikörper eingesetzt, um die CNI- und Steroiddosis niedrig halten zu können (Adam and Hoti 2009). Seit kurzem stehen auch die mTOR-Inhibitoren (engl. *mammalian target of rapamycin*) Everolimus und Sirolimus als Immunsuppressiva zur Verfügung. Von ihnen ist momentan nur Everolimus für die Lebertransplantation in Deutschland zugelassen (Wiesner and Fung 2011; Herzer, Paul et al. 2013).

Die häufigste Langzeitkomplikation nach OLT sind Nierenschäden, die in erster Linie durch die Langzeitgabe von CNI verursacht werden (Saner, Cicinnati et al. 2012; Herzer, Paul et al. 2013). Innerhalb von zehn Jahren nach OLT sind etwa 30 – 50 % der Patienten von einem chronischen Nierenversagen (Glomeruläre Filtrationsrate <30 ml/min) betroffen. Etwa ein Fünftel aller Patienten benötigen innerhalb dieser zehn Jahre eine Nierentransplantation (Weber, Ibrahim et al. 2012). Weitere Nebenwirkungen der CNI, die mit denen der Kortikosteroide übereinstimmen, sind Anfälligkeit für Infektionen, Neurotoxizität, Hypertonie, Hyperlipidämie, *de novo* Diabetes mellitus und Hirsutismus (Furukawa and Todo 2004; Otto 2013). Etwa 16 % der Todesursachen nach Lebertransplantation lassen sich auf Infektionen zurückführen (Watt, Pedersen et al. 2010). Die Inzidenz des Diabetes mellitus beträgt bis zu 26 % und etwa 10 % der lebertransplantierten Patienten sterben langfristig an kardiovaskulären Komplikationen (Pascher, Nebrig et al. 2013). Eine weitere, nicht zu unterschätzende Komplikation der Langzeitimmunsuppression ist die Entwicklung von *de novo* Malignomen. Das Risiko an einem solchen Malignom zu erkranken, ist dabei um das 2 – 4fache höher als in einer nichttransplantierten Vergleichspopulation (Bachir and Larson 2012; Herzer, Paul et al. 2013). Am häufigsten

treten Hauttumore auf, gefolgt von lymphoproliferativen Erkrankungen, kolorektalen Tumoren sowie Tumoren der Lunge und des Oropharynx (Bachir and Larson 2012).

Eine weitere Möglichkeit der Vermeidung unerwünschter Nebenwirkungen durch langfristige Immunsuppression ist das Erreichen einer operationalen Toleranz. Der Begriff ‚operationale Toleranz‘ ist definiert als das Fehlen einer schädlichen, immunologischen Reaktion gegen das Transplantat trotz Abwesenheit der immunsuppressiven Medikation (Liu, Hu et al. 2013). Die Leber wird in diesem Zusammenhang als immunologisch privilegiert angesehen, da es bei keinem anderen Organ häufiger zur Entwicklung einer operationalen Toleranz kommt. Zudem ist das Leber-Allograft resistenter gegenüber Antikörpervermittelter Abstoßung als andere solide Organe. Hyperakute Abstoßungsreaktionen sind ausgesprochen selten (Liu, Hu et al. 2013). In mehreren klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass etwa 20 – 40 % der adulten, lebertransplantierten Patienten eine operationale Toleranz entwickeln, wenn die immunsuppressiven Medikamente nach einer gewissen Zeit ausgeschlichen werden (Devlin, Doherty et al. 1998; Girlanda, Rela et al. 2005; Orlando, Manzia et al. 2008; Pons, Ramirez et al. 2009; Bohne, Martinez-Llordella et al. 2012). Pons et al. zeigten, dass bei diesen Patienten sowohl die Nephrotoxizität als auch andere, durch CNI verursachte Nebenwirkungen verringert werden konnten (Pons, Ramirez et al. 2009). In einer weiteren Studie mit ausschließlich Hepatitis C-positiven Patienten wurde in der toleranten Gruppe eine signifikant verminderte Inzidenz von *de novo* Diabetes mellitus, kardiovaskulären Problemen und opportunistischen Infektionen nachgewiesen (Orlando, Manzia et al. 2008). Die operationale Toleranz, die lange Zeit als eine Art „Heiliger Gral“ der Transplantationsmedizin angesehen wurde, gilt heutzutage als ein zwar seltenes, aber erreichbares Ereignis (Liu, Hu et al. 2013). Derzeit wird intensiv an Biomarkern geforscht, die die Entwicklung einer Toleranz nach Absetzen der Immunsuppression vorhersagen können (Levitsky 2011). Ein weiterer Ansatz ist die Suche nach Methoden, mit denen eine operationale Toleranz induziert werden kann. Eine solche tolerogene Strategie ist zum Beispiel die Erzeugung eines gemischten Chimärismus durch Infusion von Stammzellen aus dem Knochenmark des Spenders. Auf diese Weise soll gegen die Zellen des Spenders eine vom Immunsystem ausgehende, zentrale Toleranz entwickelt werden, die sich auch auf die im Anschluss transplantierte Leber erstreckt. Hierzu existieren mehrere vielversprechende Fallberichte (Donckier, Troisi et al. 2004; Donckier, Troisi et al. 2006; Granot, Loewenthal et al. 2012). Eine Infusion der Spender-Stammzellen einige Jahre nach OLT brachte jedoch keine Vorteile bezüglich der Entwicklung einer operationalen Toleranz (Tryphonopoulos, Tzakis et al. 2005). Weitere tolerogene Strategien sollen die immunregulativen Eigenschaften autologer, mesenchymaler Stammzellen oder regulativer T-Zellen ausnutzen (Liu, Hu et al. 2013).

Im Gegensatz zur OLT ist die HcTx derzeit keine standardisierte Therapieoption des finalen Leberversagens. Sie wurde in Deutschland bislang nur einige wenige Male durchgeführt, während es weltweit aktuell etwa 100 Fallberichte gibt (Fisher and Strom 2006; Ott, Schneider et al. 2006). Der größte limitierende Faktor der HcTx ist die schlechte Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger Hepatozyten (Puppi, Strom et al. 2011). In der Regel werden die Zellen aus Organen oder Organteilen gewonnen, die für die OLT abgelehnt wurden. Angesichts des elementaren Mangels an Spenderorganen stehen solche Organe jedoch nur sehr eingeschränkt zur Verfügung. Zudem geht der Trend aktuell dahin, auch Lebern mit leicht verminderter Qualität für die Organtransplantation zu verwenden (Pascher, Nebrig et al. 2013). Dies führt dazu, dass die für die HcTx zur Verfügung stehenden Organe oft von marginaler Qualität sind (Dhawan, Strom et al. 2010; Puppi, Strom et al. 2011). Aus diesem Grund steht die Suche nach alternativen Zellquellen derzeit im Fokus der Forschung.

Hughes et al. haben erfolgreich Hepatozyten aus Spendern mit Organentnahme nach Herzstillstand („non-heart-beating donor“) isoliert und diese in zwei Fällen auch transplantiert (Hughes, Mitry et al. 2006). Solche Organe werden aktuell nicht für die OLT verwendet und stünden daher allein der HcTx zur Verfügung. Bhogal et al. gelang die Isolierung von Hepatozyten aus erkrankten Lebern, die im Rahmen einer OLT explantiert wurden. Zellzahl, Viabilität und Erfolg der Isolierungen variierten zwar deutlich, waren aber neben der zugrunde liegenden Erkrankung vor allem abhängig von der Zeitverzögerung zwischen Organentnahme und Beginn der Zellisolierung, *de facto* also eher technisch bedingt (Bhogal, Hodson et al. 2011). In zwei weiteren Studien wurden sehr erfolgreich Hepatozyten aus explantierten Lebern isoliert. Gramignoli et al. gelang es sogar, anhand von fünf Lebern die repopulativen Fähigkeiten dieser Hepatozyten im Tiermodell nachzuweisen (Gramignoli, Tahan et al. 2013; Kleine, Riemer et al. 2014).

Einen anderen Ansatz bietet die Erzeugung immortalisierter humaner Hepatozyten. Mit ihnen gelang es, Ratten nach 90 %iger Leberteilresektion erfolgreich zu behandeln, ohne dass es zu einer Tumorentwicklung kam (Kobayashi, Fujiwara et al. 2000).

Große Aufmerksamkeit wird der Generierung von Hepatozyten oder hepatozytenähnlichen Zellen aus mesenchymalen Stammzellen (engl. *mesenchymal stem cells*, MSC) zuteil. Letztere lassen sich vergleichsweise einfach auch aus adultem Gewebe gewinnen und können *in vitro* problemlos expandiert werden (Kim and Cho 2013). In der Regel werden hierbei autologe Zellen genutzt, was eine Immunsuppression nach der Transplantation überflüssig macht. In mehreren Studien ließen sich MSC unterschiedlicher Herkunft zu hepatozytenähnlichen Zellen ausdifferenzieren. Der Versuch, geschädigte Lebern im Mausmodell mit MSC vor oder nach deren Ausdifferenzierung zu repopu-

larisieren, brachte jedoch widersprüchliche Ergebnisse ein (Aurich, Mueller et al. 2007; Baertschiger, Serre-Beinier et al. 2009; Marongiu, Gramignoli et al. 2011; Zagoura, Roubelakis et al. 2011).

Seit einigen Jahren besteht die Möglichkeit, aus somatischen Zellen mittels Reprogrammierung des Genoms sogenannte ‚induzierte pluripotente Stammzellen‘ (engl. *induced pluripotent stem cells*) zu erzeugen. Aus diesen können wiederum Zellen aller drei Keimblätter hervorgehen. Die hierbei gewinnbaren, hepatozytenähnlichen Zellen hatten jedoch bislang einen unreifen Phänotyp (Subba Rao, Sasikala et al. 2013; Gerbal-Chaloin, Funakoshi et al. 2014).

Über den Weg einer induzierten, „lediglich“ multipotenten Stammzelle gelang es kürzlich, aus Fibroblasten hepatozytenähnliche Zellen zu gewinnen, die nach HcTx ein Leberversagen im Mausmodell verhindern konnten (Zhu, Rezvani et al. 2014).

Der klinische Einsatz dieser Zellen sowie der anderen Stamm- und Vorläuferzellen wird jedoch kritisch gesehen, da sie möglicherweise ein tumorerzeugendes Potential mit sich bringen. Dies zeigte der Fall eines Jungen, der vier Jahre nach Behandlung mit fetalen, neuralen Stammzellen einen multifokalen Gehirntumor entwickelte. Der Tumor ging offenbar aus den transplantierten Zellen hervor (Amariglio, Hirshberg et al. 2009). Auch wenn es bis dahin keine derartigen Probleme gab und erste klinische Studien mit fetalen LcProg bereits durchgeführt wurden (Khan, Shaik et al. 2010), sollte die Sicherheit des Einsatzes dieser Zellen vor ihrer Anwendung am Menschen ausreichend belegt werden (Puppi, Strom et al. 2011).

Der gegenwärtige Mangel an geeigneten Zellquellen steht im starken Widerspruch zu den hohen Zellzahlen, die für eine erfolgreiche HcTx benötigt werden. Bei Kindern mit angeborenen, metabolischen Defekten werden bis zu  $10^8$  Zellen/kg Körpergewicht infundiert, was etwa 5 % der Lebermasse entspricht (Hughes, Mitry et al. 2012). Die Notwendigkeit solch hoher Zellzahlen basiert vor allem auf der niedrigen Effizienz, mit der sich die Zellen in das Leberparenchym integrieren. Im Rattenmodell wurde nachgewiesen, dass etwa 70 % der transplantierten Hepatozyten in den Portalkanälen stecken bleiben und innerhalb der ersten 24 – 48 Stunden durch das Immunsystem des Empfängers abgebaut werden (Gupta, Rajvanshi et al. 1999; Joseph, Malhi et al. 2002). Dies erfolgte unabhängig davon, ob es sich um syn- oder allogene Zellen handelte. Die dabei auftretende Entzündungsreaktion führte zu einer vorübergehenden Schädigung der sinusoidalen Endothelzellen, wodurch allerdings die Einwanderung der überlebenden transplantierten Hepatozyten in das Leberparenchym erleichtert wurde (Gupta, Rajvanshi et al. 1999). Die Forschung in diesem Bereich konzentriert sich auf eine Präkonditionierung des Empfängers, mit der die Effizienz der HcTx erhöht werden soll. Die dafür im Tiermodell angewandten Methoden (Expression von Transgenen, Leberteilresektionen, Verab-

reichung von Lebertoxinen) eignen sich jedoch nur bedingt für den klinischen Einsatz am Menschen. Aktuelle Ansätze für die klinische Anwendung zielen unter anderem darauf ab, die KUPFFER-Zellen des Empfängers zu hemmen oder die sinusoidalen Endothelzellen reversibel zu schädigen. Beides wurde im Rattenmodell erfolgreich angewandt (Joseph, Malhi et al. 2002; Malhi, Annamaneni et al. 2002).

Ebenfalls im Nagermodell konnte zudem die Integration fetaler Hepatozyten ins Gewebe durch gemeinsame Infusion mit MSC verbessert werden (Joshi, P et al. 2012). Weitere Strategien beinhalten geringdosierte Bestrahlung, Embolisation der Portalvene oder sogar Leberteilresektionen, die einen mitotischen Stimulus setzen und somit die transplantierten Zellen im Gewebe zur Proliferation anregen sollen (Puppi, Strom et al. 2011).

Will man Hepatozyten wiederholt infundieren oder für die Anwendung im Notfall bereit halten, ist eine Kryokonservierung der Zellen notwendig. Dies hat jedoch einen verheerenden Effekt auf die Hepatozyten, die nach dem Auftauen eine deutlich verminderte Viabilität und einen verringerten Ausplattierungserfolg aufweisen. Zudem werden Proteinsynthese und Enzymaktivität nachteilig beeinflusst (Terry, Dhawan et al. 2006). In einer umfangreichen Studie wurden die Bedingungen der Kryokonservierung optimiert und die Qualität der gelagerten Zellen verbessert (Terry, Dhawan et al. 2010). Kryokonservierte Hepatozyten gelten jedoch weiterhin als weniger effizient bei der Repopularisierung der Leber *in vivo* (Puppi, Strom et al. 2011).

Ein anderer Ansatz sieht vor, die Hepatozyten vorübergehend bei 4 °C zu lagern, um so wiederholte HcTx innerhalb kürzerer Zeitabstände zu ermöglichen. In einer entsprechenden Studie war die Lagerung von Hepatozyten unter optimierten Bedingungen für bis zu zwei Wochen ohne bedeutende Zellverluste möglich (Pless, Sauer et al. 2012).

## 2.6 Konzept des Neohybriden Lebertransplantates (Neo-Hybrid Liver Graft)

Das Fernziel des Projektes beinhaltet ein neuartiges Konzept, mit dessen Hilfe eine operationale Toleranz nach OLT durch *in vivo* Tissue-Engineering erreicht werden soll. Die Kombination der standardisierten Therapieoption OLT mit einer autologen Zelltransplantation soll die Überlebensraten nach OLT deutlich verbessern und die lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva minimieren.

In der praktischen Durchführung sollen hierfür sowohl Hepatozyten als auch LcProg aus bei OLT explantierten Lebern isoliert und anschließend im Rahmen einer HcTx in den eigenen Organismus zurücktransferiert werden. Das Leber-Allograft dient dabei als biologische Matrix, in die die retransplantierten Zellen einwachsen sollen. Es wird die Hypothese aufgestellt, dass es auf Grund der immunologischen Selektionsvorteile der autologen Zellen anschließend zu einer breiten Repopularisierung des Leber-Allografts kommt. Auf diese Weise entsteht das neohybride Lebertransplantat, welches deutlich weniger immunogen ist. Es wird postuliert, dass mit Hilfe der verminderten Immunogenität die notwendige Immunsuppression nach OLT auf ein Minimum reduziert werden kann oder sogar eine operationale Toleranz induziert wird.

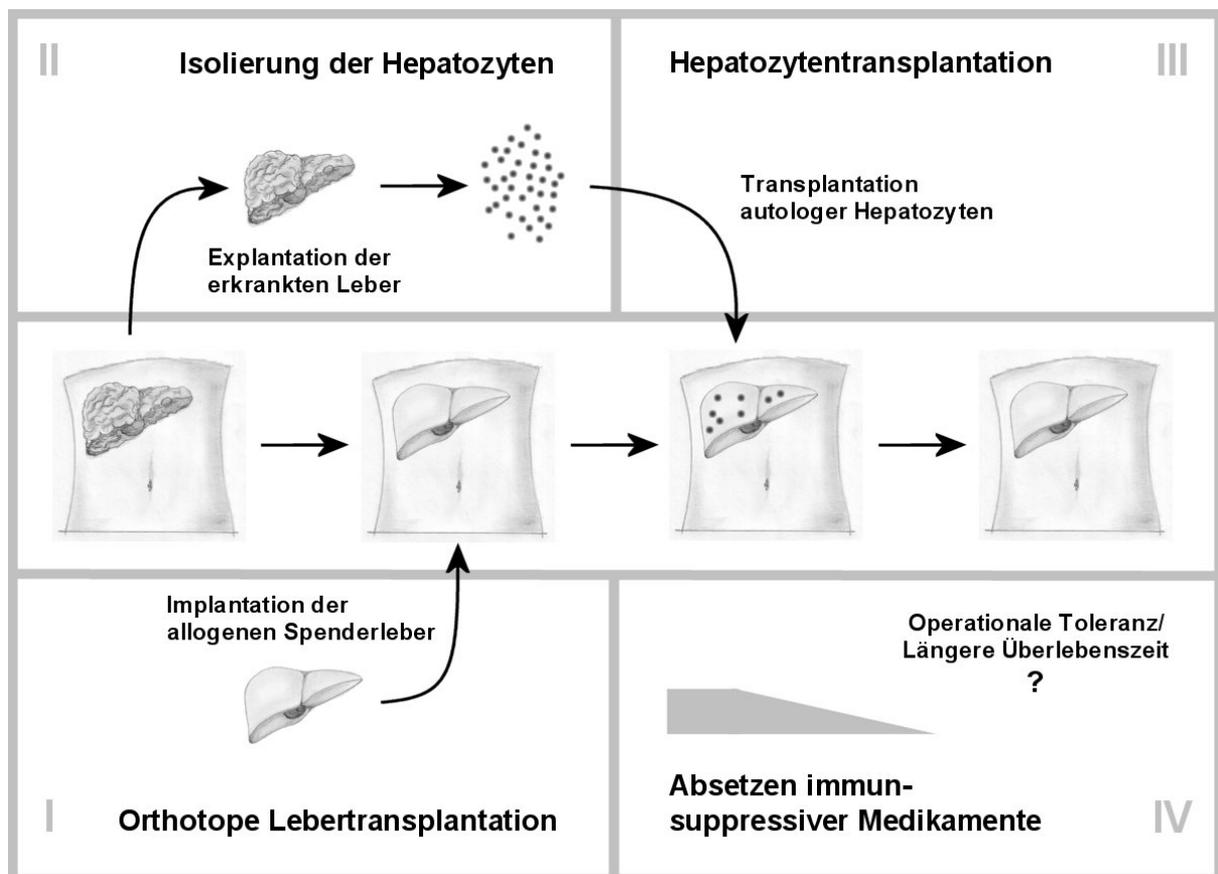


Abb. 2-3: Schema der Erzeugung eines Neohybriden Lebertransplantates

Grafik: Prof. Dr. Sauer, mit Erlaubnis

Dieses Konzept wird derzeit am Rattenmodell validiert. Weibliche Ratten vom Stamm „Lewis“ erhielten ein Lebertransplantat einer weiblichen Ratte des Stammes „Dark Agouti“. Diese Stammkombination dient als Modell der akuten Abstoßung in der Ratte. In einem ersten Schritt mit dem Zweck der Konzeptprüfung wurde die Abstoßung zunächst durch die Gabe immunsuppressiver Medikamente verhindert. Am Tag nach der Lebertransplantation wurden Hepatozyten und LcProg aus einer vorbehandelten, männlichen, syngenen Lewis Ratte isoliert und der weiblichen Lewis Ratte intrasplenal appliziert. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass unter konstanter Immunsuppression eine Repopularisierung des Leber-Allografts nach 90 Tagen von 14 –16 % erfolgt (Rohn, Schroeder et al. 2016). Im Folgenden sollen mit diesem Modell Weaning-Versuche durchgeführt werden, bei denen die Immunsuppression im Anschluss an die Zelltransplantation ausgeschlichen wird. Idealerweise soll hierbei eine operationale Toleranz entstehen und der Repopularisierungsgrad gesteigert werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den ersten Ansätzen, das oben beschriebene Konzept auf humane Gewebe zu übertragen. Insbesondere sollte dabei die Eignung humaner Hepatozyten und LcProg aus explantierten Lebern für eine HcTx eruiert werden. Die zentralen Fragestellungen und Arbeitshypothesen dieser Arbeit werden in Kapitel 3 erläutert.

## 2.7 Zellisolierung aus humanen Lebern

### 2.7.1 Hepatozytenisolierung

Die Isolierung und Aufarbeitung lebender Hepatozyten startete in den 60er Jahren mit einem Kombinationsverfahren aus mechanischer und enzymatischer Verdauung an Rattenleber (Howard, Christensen et al. 1967). Dieses Verfahren wurde wenig später von Berry et al. modifiziert und ergänzt (Berry and Friend 1969). Seglen et al. entwickelten daraus die jüngste Methode der 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik (Seglen 1976). Diese Methode basiert auf dem Herauslösen der Hepatozyten aus ihrem Zellverband mit Hilfe einer Enzymlösung und ist in der aktuellen Literatur umfangreich beschrieben (Pichard, Raulet et al. 2006; Knobloch, Ehnert et al. 2012). Sie wird von der Arbeitsgruppe um Prof. Sauer standardmäßig angewandt und ist in Kapitel 4.2 ausführlich dargestellt (Katenz, Vondran et al. 2007; Schwartlander, Schmid et al. 2007; Raschzok, Morgul et al. 2008; Vondran, Katenz et al. 2008; Raschzok, Sallmon et al. 2012).

### 2.7.2 Isolierungsmethoden für Leberzellvorläufer

Aktuell werden unterschiedliche Methoden zur Isolierung und Aufreinigung von LcProg genutzt und teilweise auch miteinander kombiniert. Häufig erfolgt die Isolierung von Hepatozyten und LcProg parallel, so dass auch für die LcProg im ersten Schritt die oben genannte 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik angewandt wird. Die Abtrennung der Hepatozyten erfolgt dann im Anschluss durch Zentrifugation bei niedrigen Geschwindigkeiten von  $50 \times g$  (Selden, Chalmers et al. 2003; Gerbal-Chaloin, Duret et al. 2010). Die deutlich kleineren und leichteren LcProg befinden sich hierbei im Zentrifugationsüberstand und können anschließend mit unterschiedlichen Methoden separat von den Hepatozyten aufgereinigt werden.

Oftmals erfolgt zunächst ein weiterer enzymatischer Verdau mit einer Enzymlösung aus Protease und Desoxyribonuklease, um den beim Kollagenaseverdau entstandenen Zelldebris zu beseitigen (He, Tan et al. 2004; Yovchev, Grozdanov et al. 2007; Weiss, Lichtenauer et al. 2008; Dolle, Best et al. 2010). Werden die Hepatozyten nicht benötigt, kann dieser Schritt auch direkt mit dem Kollagenaseverdau kombiniert werden (Jozefczuk, Stachelscheid et al. 2010; Ono, Kawachi et al. 2011). Andere Arbeitsgruppen wiederum verzichten auf den zweiten Verdauschritt (Selden, Chalmers et al. 2003; Gerbal-Chaloin, Duret et al. 2010).

Im Anschluss folgt in der Regel eine weitere Aufreinigung der LcProg basierend auf ihrer Größe und Dichte mittels Dichtegradientenzentrifugation (Dolle, Best et al. 2010). Dabei werden zumeist diskontinuierliche Gradienten genutzt, für die von den verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Lösungsmittel verwendet werden. Dies sind z.B.

OptiPrep™ (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Yovchev, Grozdanov et al. 2007; Gerbal-Chaloin, Duret et al. 2010), Percoll® (He, Tan et al. 2004; Ono, Kawachi et al. 2011) oder LymphoPrep™ (Laurson, Selden et al. 2007).

Eine andere Möglichkeit der Isolierung von LcProg beruht auf ihrer Abtrennung anhand von bestimmten Oberflächenstrukturen. Dabei werden vorläuferspezifische Oberflächenmarker durch spezielle Antikörper gebunden und die markierten Zellen anschließend über einen *flow sorter* (engl. *Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS*®) oder mit Hilfe eines Magnetfeldes (engl. *Magnetic-Activated Cell Sorting, MACS*®) aussortiert. Für die Isolierung von LcProg mittels MACS® wurden bislang die Oberflächenmarker CD90 und EpCAM verwendet (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Weiss, Lichtenauer et al. 2008; Ono, Kawachi et al. 2011).

Ein weiterer Ansatz für die Isolierung von Vorläuferzellen beruht auf ihrer Fähigkeit, den Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 schneller und effektiver aus dem Zellinneren auszuschleusen als adulte Zellen. Diese Methode wird im Nagermodell standardmäßig zur Isolierung hämatopoetischer Stammzellen genutzt. Es gibt jedoch Ansätze, bei denen auf diese Weise auch Vorläuferzellen aus soliden Organen, wie z. B. Mausleber, isoliert werden (Wulf, Luo et al. 2003; Challen and Little 2006).

## 2.8 Hepatozytentransplantation im Mausmodell

### 2.8.1 Anwendungsbereiche

Experimentelle Tiermodelle sind ein wichtiger Bestandteil der translationalen hepato-logischen Forschung (Streetz 2013). Die Transplantation humaner Hepatozyten oder Vorläuferzellen im Mausmodell verfolgt drei grundsätzliche Ziele. Diese sind:

- der Nachweis des therapeutischen Effektes einer HcTx, deren Weiterentwicklung sowie die Erforschung der bei der Repopulation ablaufenden Prozesse,
- der Nachweis, dass bestimmte hepatische oder nichthepatische Vorläuferzellen in der Lage sind, eine Leber zu repopularisieren und sich *in vivo* zu funktionstüchtigen Hepatozyten zu differenzieren und
- die Schaffung einer humanisierten Mausleber, welche mit strikt humanpathogenen Erregern (z. B. Hepatitis B und C, Plasmodium falciparum) infiziert werden kann und somit der Entwicklung von Impfstoffen oder Medikamenten dient. Eine weitere Anwendung der humanisierten Mausleber sind Toxizitätsstudien, die Aussagen über die Wirkung einer Substanz auf humane Hepatozyten zulassen.

(Gilgenkrantz 2010)

Im Zuge dieser Anwendungsbereiche sind verschiedene Tiermodelle beschrieben, die nachfolgend vorgestellt werden sollen.

### 2.8.2 Etablierte Modelle

Gupta et al. wiesen Anfang der 90er Jahre nach, dass die intrasplenale Injektion ein sicherer und effektiver Weg zur Applikation großer Zellzahlen im Nagermodell ist (Gupta, Yerneni et al. 1993; Gupta, Vemuru et al. 1994). Zusätzlich sind Applikationswege über intravenöse, intraperitoneale oder direkt intrahepatische Injektion beschrieben (Kim, Park et al. 2011; Zagoura, Roubelakis et al. 2011). Voraussetzung für das Einwachsen (engl. *engraftment*) von Hepatozyten in die Mausleber ist eine hohe Viabilität der Zellen, die vor allem durch kurze Wärmeschämiezeiten bei der Isolierung und durch ein möglichst geringes Alter der Spender erreicht wird (Kawahara, Toso et al. 2010). Sollen allo- oder xenogene Zellen transplantiert werden, ist zudem eine Immunsuppression der Empfän-

gertiere notwendig. Dies wird in der Regel durch die Verwendung immundefizienter Tiere erreicht (Gilgenkrantz 2010).

Grundsätzlich sollten in jedem Tiermodell der HcTx zwei Bedingungen erfüllt sein, damit es zu einer Repopularisierung der Empfängerleber kommt:

1. Es muss ein Schaden an der Empfängerleber gesetzt werden, der im Organismus Regenerationsvorgänge induziert und zur Ausschüttung entsprechender Wachstumsfaktoren führt. Diese bieten dann das passende Milieu für die Vermehrung der transplantierten Zellen *in vivo*.
2. Die transplantierten Zellen benötigen einen Selektionsvorteil, mithilfe dessen sie sich gegen die nativen Hepatozyten während der Regenerationsphase durchsetzen können. Dies wird meist mittels einer chemischen oder physikalischen Proliferationshemmung der nativen Hepatozyten erreicht.

(Gilgenkrantz 2010)

Historisch gesehen wurden zunächst zwei Modelle entwickelt, die diese beiden Voraussetzungen auf Grund eines genetischen Defektes der Tiere in sich vereinen. Sogenannte uPA-Mäuse besitzen eine Albumin-gesteuerte Expression des Urokinase-Typ Plasminogen Aktivators (uPA). Dies ist ein Enzym vom Typ der Peptidasen, welches eine intrazelluläre Schädigung, besonders des endoplasmatischen Retikulums, auslöst und so zum Tod der Hepatozyten führt. Ohne lebensrettende HcTx sterben die Tiere im Alter von wenigen Tagen bis Wochen an Leberversagen. Rhim et al. entwickelten dieses Modell und führten daran auch Xenotransplantationen unter Verwendung immundefizienter uPA-Mäuse durch (Rhim, Sandgren et al. 1994; Rhim, Sandgren et al. 1995). Einige Jahre später wurde mit diesem Modell erstmals erfolgreich eine humanisierte Mausleber erzeugt (Dandri, Burda et al. 2001).

Nachteil des Modells ist die schwierige Zucht und Haltung der sehr fragilen Tiere und der enge Zeitraum des Alters der Tiere von 4 – 21 Tagen, in dem die HcTx stattfinden muss (Gilgenkrantz 2010).

Das zweite Modell beinhaltet Mäuse mit einem Defekt des Tyrosin-Metabolismus. Durch das Fehlen der Fumarylacetoacetat-Hydrolase kommt es zur Anhäufung toxischer Metaboliten des Tyrosin-Abbauweges und folglich dem Untergang der betroffenen Hepatozyten. Eine spezielle Diät, die 2-(2-Nitro-4-Trifluoromethyl-Benzoyl)1,3-Cyclohexandion (NTBC) enthält, kann den Zelluntergang aufhalten (Streetz 2013). Dieses Nagermodell der hereditären Tyrosinämie Typ 1 führt ohne Zufütterung des NTBC zu chronischem Leberversagen, welches wiederum durch Transplantation gesunder Hepatozyten verhindert werden kann (Overturf, Al-Dhalimy et al. 1996; Overturf, al-Dhalimy et al. 1997). Eine

Xenotransplantation an diesem Modell bedarf jedoch eines recht hohen Aufwandes, da eine zusätzliche Immundefizienz der Mäuse allein nicht ausreichend ist (Gilgenkrantz 2010).

Andere Tiermodelle, die zunächst an der Ratte entwickelt wurden, nutzen dagegen Tiere vom Wildtyp oder, im Falle einer Xenotransplantation, immundefiziente Tiere. Durch Verabreichung des Pyrrolizidinalkaloids Retrorsin, welches von den Hepatozyten selektiv aufgenommen und in seine aktive Form umgewandelt wird, lässt sich die Proliferation der Empfängerhepatozyten hemmen. Anschließend wird mittels partieller Hepatektomie (PH) ein Proliferationsreiz gesetzt und die HcTx durchgeführt. Auf diese Weise ließen sich Repopularisierungsraten von bis zu 98 % nach vier Monaten erreichen (Laconi, Oren et al. 1998).

Über einen längeren Zeitraum genügte auch die alleinige Gabe von Retrorsin ohne externen Proliferationsstimulus, um eine effiziente Repopularisierung zu erhalten (Laconi, Pillai et al. 2001). Auch an der Maus wurde dieses Modell erfolgreich angewandt und der Proliferationsstimulus ebenfalls durch PH oder durch Gabe des Chlorkohlenwasserstoffes Tetrachlormethan (CCl<sub>4</sub>) gesetzt (Guo, Fu et al. 2002; Joshi, P et al. 2012). Die alleinige Gabe von Retrorsin war hier jedoch nicht ausreichend, um eine Repopularisierung der Empfängerleber zu erreichen (Guo, Fu et al. 2002). Dieses Ergebnis wurde später durch einen weiteren Versuch gestützt, der nachwies, dass Retrorsin bei der Maus keinen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten hat (Zhou, Wang et al. 2006).

Ersatzweise für Retrorsin wird daher vor allem im Mausmodell Monocrotalin (MCT) eingesetzt, welches ebenfalls ein Pyrrolizidinalkaloid ist. MCT hemmt die Proliferation der Hepatozyten bei Ratte und Maus und führte in Kombination mit einer PH bei der Maus zu Repopularisierungsraten von bis zu 40 % nach vier Monaten (Witek, Fisher et al. 2005). Zusätzlich schädigt MCT die Endothelien der Lebersinusoiden und verbessert somit das Einwachsen (engl.: *Engraftment*) der Hepatozyten ins Leberparenchym (Joseph, Kumaran et al. 2006; Wu, Joseph et al. 2008). Die Gabe von MCT allein war im Mausmodell nicht ausreichend, eine Proliferation der transplantierten Zellen zu bewirken. Es musste zusätzlich mindestens eine lebertoxische Substanz verabreicht werden (Wu, Joseph et al. 2008).

Ein weiterer Ansatz beschäftigt sich damit, die zu transplantierenden Zellen genetisch so zu modifizieren, dass sie gegen einen Angriff auf die Empfängerhepatozyten geschützt sind. Im Bcl-2/Fas-Modell werden die Spenderzellen mit dem antiapoptotischen Faktor Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma 2*) ausgestattet, der sie nach der Transplantation gegen eine Fas-Rezeptor-induzierte Apoptose schützt. Diese wird durch die mehrmalige Applikation eines Fas-agonistischen Antikörpers ausgelöst. Im Mausmodell konnte damit eine Repopularisierung von 16 % nach acht bis zwölf Wochen durch transgene, Bcl-2-positive

Spenderhepatozyten erreicht werden (Mignon, Guidotti et al. 1998). Auch Xenotransplantationen mit Hepatozyten der Ratte und der humanen Zelllinie HepaRG wurden mit diesem Modell erfolgreich durchgeführt. Eine Modifikation der zu transplantierenden Zellen war dabei nicht notwendig, da sie den Fas-agonistischen Antikörper für die Maus nicht binden (Wilson, Paturzo et al. 2006; Jiang, Li et al. 2010).

Neuere Tiermodelle der humanisierten Mausleber erzeugen Tiere, die zugleich auch ein humanisiertes Immunsystem entwickeln. Dies wird durch Transplantation humaner hämatopoetischer Stammzellen allein oder in Kombination mit humanen fetalen Hepatozyten und Thymozyten erreicht. Solche Modelle dienen jedoch vor allem der Erforschung strikt humanpathogener Viren (Akkina 2013).

### 3 Zentrale Fragestellung und Arbeitshypothesen

Im Rahmen des Projektes des Neohybriden Lebertransplantates wurden drei Arbeitshypothesen aufgestellt und geprüft:

- 1) *Aus chronisch erkrankten Lebern, die im Rahmen einer OLT explantiert werden, können Hepatozyten mit vergleichbarer Viabilität und Funktion wie bei der Isolierung aus unverändertem Lebergewebe gewonnen werden. Dies stellt die Grundvoraussetzung für ihre Eignung zur Zelltransplantation dar.*

Hierfür wurden die Ergebnisse der Zellisolierung und -kultur von Hepatozyten aus hochgradig erkranktem und unverändertem Lebergewebe verglichen. Zudem wurden Hepatozytenfunktionstests durchgeführt und eine Lagerung der Zellen bei 4°C über 24 und 48 h geprüft.

- 2) *Chronisch erkrankte Lebern, die im Rahmen einer OLT explantiert werden, enthalten mehr Leberzellvorläufer als unverändertes Lebergewebe. Art und Anzahl der Leberzellvorläufer sind dabei abhängig von der Grunderkrankung.*

Hierfür wurde die Nichtparenchymale Zellfraktion aus hochgradig erkranktem und unverändertem Lebergewebe mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Mit Hilfe der Ergebnisse wurde zudem die Anreicherungsmethode für die Anwendung am Mausmodell optimiert.

- 3) *Die Applikation des Pyrrolizidinalkaloids Monocrotalin 12 – 24 h vor der Transplantation von Hepatozyten im Mausmodell verbessert deren Repopularisierung der Mausleber.*

In Vorbereitung der Transplantation von aus erkrankten Lebern gewonnenen Hepatozyten und Leberzellvorläufern wurde ein neuartiges Repopularisierungsmodell in der Maus entwickelt und getestet.



---

## 4 Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Chemikalien werden im Text namentlich erwähnt und sind in Anhang 11.1.1 tabellarisch unter Angabe des Herstellers aufgeführt. Die Inhaltsstoffe und Herstellungsanleitung der selbst angefertigten Puffer und Lösungen werden in Anhang 11.1.2 und 11.1.3 aufgeführt.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Laborarbeiten erforderten zum Teil mehrere, parallel arbeitende Personen. Alle beteiligten Personen werden in Kapitel 4.10 unter Angabe ihrer jeweiligen Funktionen gesondert aufgeführt.

### 4.1 Herkunft der Lebergewebe

Die für die Versuche genutzten Leberteilstücke wurden an der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité Berlin nach schriftlicher Einwilligung der betroffenen Patienten entnommen. Es handelte sich dabei ausnahmslos um Gewebe, das im Rahmen einer Leberteilresektion oder Lebertransplantation ohnehin entfernt wurde. Das Vorgehen wurde zuvor von der Ethikkommission der Charité Berlin in einem entsprechenden Antrag genehmigt (Antragsnummer: EA4/088/10, Ethikantrag vom 04.04.2012).

Angesichts der Infektionsgefahr für die Experimentatoren wurde der Nachweis von HBV oder HCV als Ausschlusskriterium für beide Gewebesorten festgelegt. Des Weiteren wurden auf Grund einer neoplastischen Grunderkrankung explantierte Lebern vom Versuch ausgeschlossen.

## 4.2 Isolierung und Aufreinigung von Hepatozyten

Die Hepatozyten aus explantiertem Lebergewebe und Leberteileresektaten wurden mit Hilfe einer 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik isoliert, für die ein standardisiertes Protokoll in der Arbeitsgruppe existiert (Vondran, Katenz et al. 2008). Parallel dazu erfolgte die Isolierung und Anreicherung potenzieller LcProg aus der Nichtparenchymalen Zellfraktion (engl. *non parenchymal cells*, NPC) des Lebergewebes über zwei verschiedene Methoden (siehe Kap. 4.5).

Es wurden die Hepatozyten aus 23 explantierten Lebern und 14 Leberteileresektaten isoliert. Eine Übersicht der zugrunde liegenden Erkrankungen ist in Tab. 4-1 dargestellt. Das jeweilige Leberteilstück für die Zellisolierung wurde direkt nach Entnahme der explantierten Leber oder des Leberteileresektates unter sterilen Kautelen im OP abgetrennt. Dabei wurde darauf geachtet, eine möglichst kleine Schnittfläche zu erhalten, um so die spätere Kanülierung zu vereinfachen. Die Probe wurde anschließend in sterilem Medium auf Eis ins Labor transportiert und gewogen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten unter aseptischen Bedingungen in einer Sterilwerkbank (Lamin Air<sup>®</sup> HBB 2448). Zunächst wurde in die sichtbaren Blutgefäße auf der Schnittfläche ein speziell dafür angefertigtes Kanülierungsset eingeführt und je drei bis fünf Kanülen mit Gewebekleber (Histoacryl<sup>®</sup>) in den Gefäßen fixiert (Abb. 4-1). Anschließend wurde das Leberteilstück mit einer Perfusionslösung, die Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA) enthielt, bei 37 °C gespült und entblutet. Daraufhin folgte der Verdau unter Anwendung einer 0,1%igen Kollagenaselösung, die ebenfalls bei 37 °C in einem Kreislaufverfahren durch das Leberteilstück geleitet wurde (Abb. 4-2). Der Fortschritt des Verdaus wurde anhand der Konsistenz des Gewebes makroskopisch beurteilt und die Verdauzeit entsprechend angepasst. War die Konsistenz ausreichend weich und das Parenchym brüchig, wurde der Verdau durch Zugabe einer kalten, albuminhalten Stopplösung (Stopplösung für die Zellisolierung) beendet. Das Leberteilstück wurde mit einem Skalpell (Disposable Skalpell) aufgeschnitten und die Zellen durch Schütteln oder unter Zuhilfenahme eines Zellschabers (Cell Scraper 16 cm) in die Stopplösung entlassen. Die Zellsuspension wurde durch einen Gazetupfer (Mullkompressen 10x10 cm) filtriert und in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon<sup>®</sup>) überführt. Durch die anschließende erste Zentrifugation (50 x g, 5 min, 4 °C) wurden die Hepatozyten von der NPC im Überstand getrennt. Letztere enthielt die LcProg und wurde getrennt von den Hepatozyten aufgearbeitet (siehe Kap. 4.5.1 und 4.5.2). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die pelletierten Hepatozyten wurden in modifiziertem William's Medium E (mod. Will E) resuspendiert und mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Diese diente der Anreicherung viabler Hepatozyten in der Zellsuspension durch die Elimination beschädigter und toter Zellen (Bhagal, Hodson et al. 2011). Für die Herstellung

des Gradienten wurden 20 ml einer 25%igen Silikagel-Partikel-Lösung (Easycoll<sup>®</sup>, Dichte 1,124 mg/ml) in phosphatgepufferter Salzlösung (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) mit je 5 ml Zellsuspension überschichtet und bei 1474 x g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Hepatozyten im Pellet einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden Zellzahl und Viabilität der Hepatozyten mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstests (TBE) bestimmt.



Abb. 4-1: **Leberteilstück einer explantierten Leber zu Beginn der Kanülierung**

Auffällig ist das hochgradig veränderte Leberparenchym. Die Kanülen wurden mit Gewebekleber in den Gefäßen fixiert.

Der TBE beruht auf einer fehlenden Durchlässigkeit der Membran lebender Zellen für den Farbstoff Trypanblau. Bei toten oder stark geschädigten Zellen dagegen ist die Zellmembran durchlässig, so dass der Farbstoff in die Zelle eindringt und dort lichtmikroskopisch nachgewiesen werden kann. Zur Durchführung des TBE wurden je 50 µl der entsprechenden Zellsuspension mit 450 µl einer 1:4 verdünnten Trypanblaulösung in PBS (Trypan Blue Solution 0,4 %) versetzt. Die anschließende Zählung erfolgte unter 100facher Vergrößerung in einer Neubauer-Zählkammer (Neubauer Improved). Hierfür

wurden in acht großen Eckquadraten jeweils die Anzahl viabler und toter Zellen bestimmt, wobei mindestens 100 Zellen ausgezählt wurden. Aus diesen Werten konnte die Anzahl viabler Hepatozyten je Milliliter, die Gesamtanzahl viabler Hepatozyten sowie deren Viabilität auf folgende Weise bestimmt werden:

$$\frac{\text{Anzahl viabler Hc}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{der viablen Hc in acht großen Eckquadraten}}{8} \times 10 \times \frac{10.000}{\text{ml}}$$

$$\text{Gesamtanzahl viabler Hc} = \frac{\text{Anzahl viabler Hc}}{\text{ml}} \times \text{Volumen der Zellsuspension in ml}$$

$$\text{Viabilität der Hc in \%} = \frac{\text{Gesamtanzahl viabler Hc}}{\text{Gesamtanzahl viabler und toter Hc}} \times 100$$

(Hc: Hepatozyten)

Auf Grund der erreichten Zellzahlen und Viabilitäten wurden die einzelnen Isolierungen als „*erfolgreich*“ oder „*nicht erfolgreich*“ bewertet. Für eine erfolgreiche Isolierung musste eine Anzahl viabler Hepatozyten von mindestens 5 Mio. pro 10 g Lebergewebe und eine Viabilität von mindestens 70 % erreicht werden. Die Mindestanzahl viabler Zellen ergab sich aus der notwendigen Zellzahl für weitere Untersuchungen *in vitro*. Zudem entsprach sie, hochgerechnet auf eine gesamte Leber von 1500 – 2000 g, in etwa der Menge an Zellen, die bereits im Rahmen von klinischen Versuchen bei einer HcTx verwendet worden sind (Lanzoni, Oikawa et al. 2013). Die Mindestviabilität von 70 % wurde aus den Erfahrungen der Arbeitsgruppe hergeleitet, ab welchem Wert eine erfolgreiche Kultivierung oder Lagerung der Hepatozyten möglich ist.

Für weitere Untersuchungen an den Hepatozyten wurden ausschließlich Zellen aus erfolgreich isolierten Leberteilstücken verwendet. Für die Isolierung und Charakterisierung der NPC wurden ergänzend auch nicht erfolgreich isolierte Leberteilstücke verwendet. Dies ist unproblematisch, da LcProg deutlich widerstandsfähiger sind als Hepatozyten und auch nach intensivem Enzymverdau oder langen Kälteischiemezeiten erfolgreich isoliert werden können (Ono, Kawachi et al. 2011; Aupet, Simone et al. 2013).

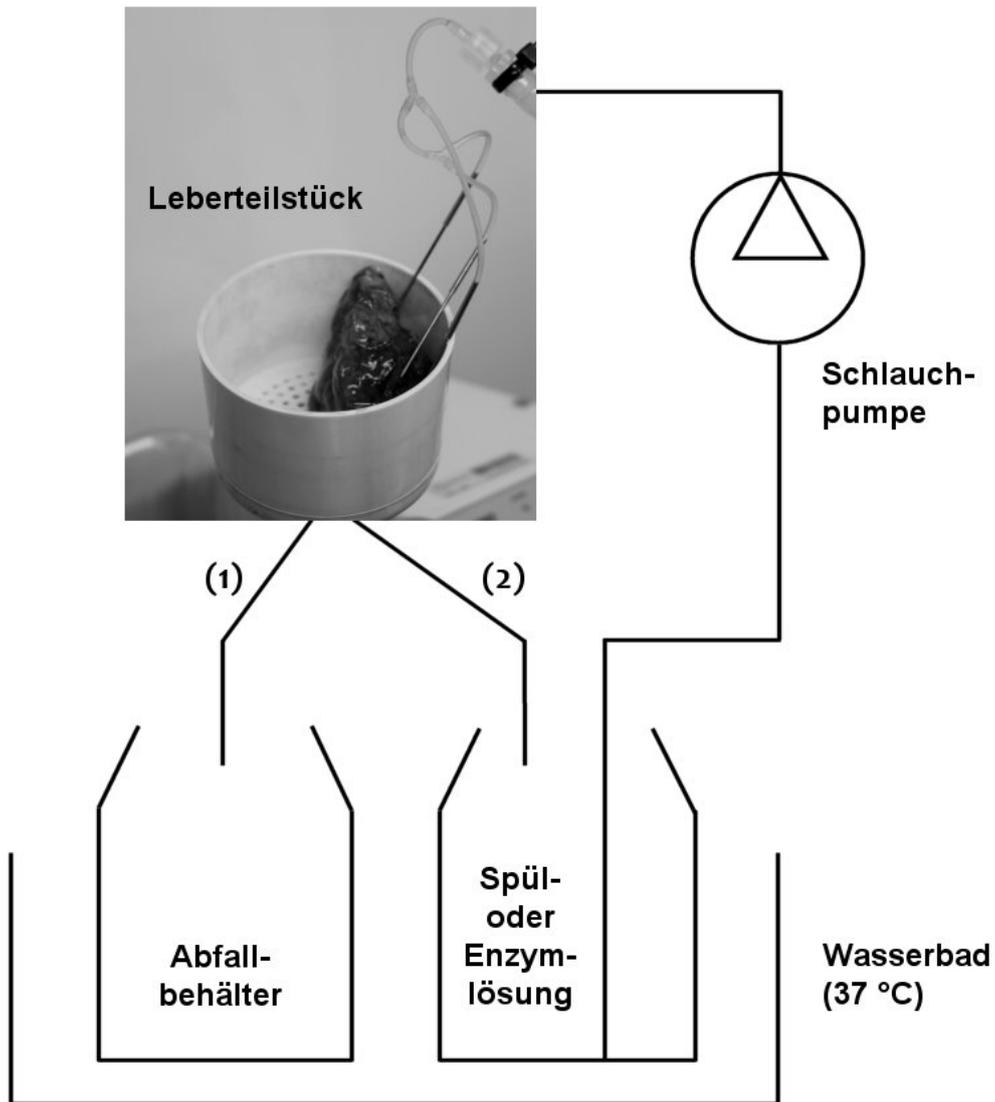


Abb. 4-2: **Versuchsaufbau der 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik**

Im ersten Schritt wurde das Leberteilstück mit einer EGTA-haltigen Perfusionslösung gespült und entblutet. Die aus dem Gewebe austretende Flüssigkeit gelangte dabei in den Abfallbehälter (1). Im zweiten Schritt wurde der Verdau mit einer Kollagenase-haltigen Lösung durchgeführt, die in einem Kreislaufverfahren durch das Leberteilstück geleitet wurde (2).

	Hc-Isolierung		Kühl- lagerung	Zell- kultur	Anreicherung NPC	
	gesamt	erfolgreich			OPTI	MACS®
<b>Explantierte Lebern</b>	23	12	4	8	8	6
Zirrhose	13	7	2	5	4	2
PSC	7	4	2	3	4	4
ALV	2	0	-	-	-	-
Budd Chiari	1	1	-	-	-	-
<b>Leberteil- resektate</b>	-	14	6	5	8	-
CholCA	-	6	2	-	4	-
Metastasen	-	8	4	5	4	-

Tab. 4-1: **Art und Anzahl der verwendeten Leberproben**

Hc: Hepatozyten; NPC: Nichtparenchymale Zellfraktion; OPTI: OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation; MACS®: Magnetic-Activated Cell Sorting; PSC: Primär Sklerosierende Cholangitis; ALV: Akutes Leberversagen; Budd Chiari: Budd-Chiari-Syndrom; CholCA: Cholangiozelluläres Karzinom

Nicht erfolgreich isolierte Leberteilresektate wurden nicht dokumentiert.

### 4.3 Kühlagerung der Hepatozyten für zwei Lagerungsmedien im Vergleich

Die Isolierung humaner Hepatozyten aus explantierten Lebern ist auf Grund der Unvorhersehbarkeit einer Lebertransplantation kein im Voraus planbarer Versuch. Für eine Transplantation von Hepatozyten im Mausmodell ist jedoch eine Vorbehandlung der Tiere notwendig (siehe Kap. 2.8.2). Daher sollten die frisch isolierten, lebenden Hepatozyten für etwa 24 – 48 Stunden gelagert werden. In dieser Zeit würde die Vorbehandlung der Mäuse erfolgen, um ihnen anschließend die kühl gelagerten Hepatozyten zu transplantieren. Die Medien ChillProtec® und ChillProtec® plus ermöglichen laut Herstellerangaben eine Lagerung primärer humaner Hepatozyten bei 2 – 8 °C über mehrere Tage. Die Kühlagerung von Hepatozyten aus explantierten Lebern wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem separaten Versuch im Vorfeld getestet und mit Hepatozyten aus unverändertem Gewebe nach Leberteilresektion verglichen (*Cold Storage* Versuch). Als Vergleichslösung diente das Zellkulturmedium mod. Will E.

Es wurden die Hepatozyten von vier explantierten Lebern und sechs Leberteilresektaten verwendet. 14 Mio. frisch isolierte, viable Hepatozyten wurden je in 14 ml ChillProtec®, ChillProtec® plus und mod. Will E resuspendiert und laut Herstellerangaben bei 4 °C in 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon®) liegend gelagert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen erneut resuspendiert, je 7 ml der Zellsuspensionen abgenommen und ein TBE durchgeführt. Die restliche Zellsuspension wurde wiederum für 24 Stunden bei 4 °C liegend gelagert und anschließend ebenfalls gezählt. Entsprechend ergaben sich drei Zeitpunkte der Zellzählung für jedes der drei unterschiedlichen Lagermedien. Die Zeitpunkte wurden 0 h, 24 h und 48 h genannt. Für die Lagermedien wurden folgende Kürzel verwandt: CP (ChillProtec®), CP+ (ChillProtec® plus) und mod. Will E (modifiziertes Williams Medium E). Eine Übersicht des Versuches ist in Abb. 4-3 dargestellt.

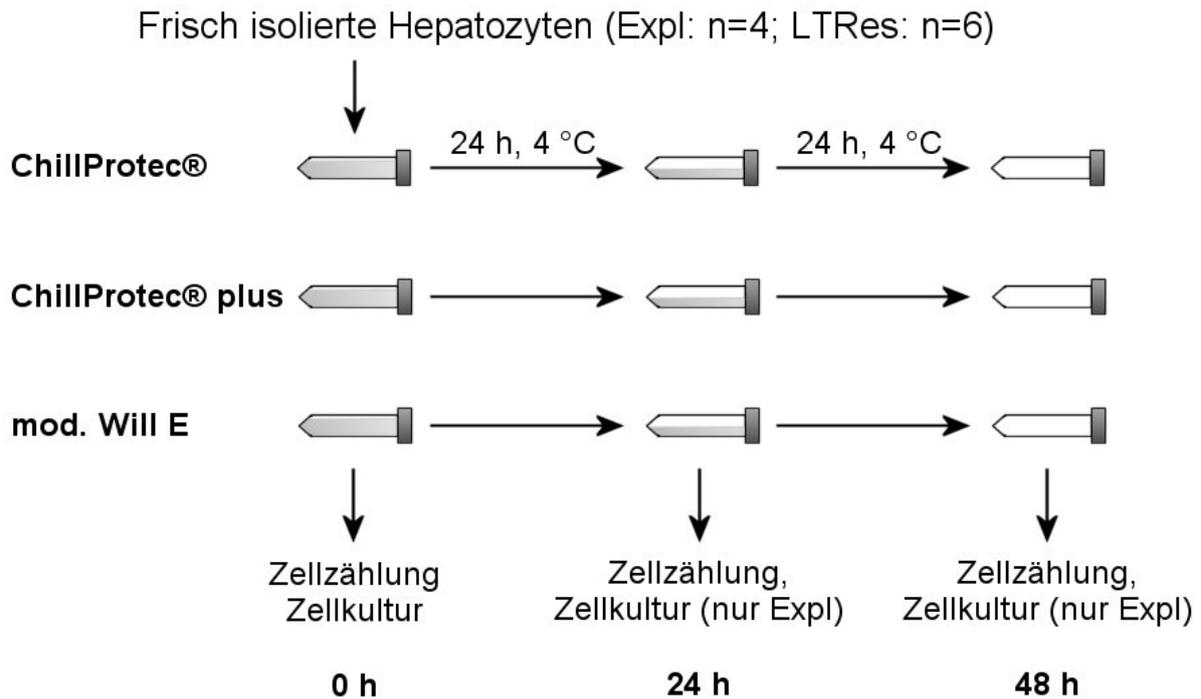


Abb. 4-3: Schematische Darstellung des *Cold Storage* Versuches

Expl: Explantierte Leber; LTRes: Leberteilresektat; mod. Will E: modifiziertes Williams Medium E

Des Weiteren wurden die Zellen aus explantierten Lebern an allen drei Zeitpunkten ausgesät und über fünf Tage in Kultur gehalten. Aussaat und Pflege der Zellkultur (Bebrüten, Waschen und Mediumwechsel) erfolgte wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben. Für jedes Lagermedium wurden zu jedem der drei Zeitpunkte abhängig von der Zellzahl mindestens zwei bis drei Wells ausgesät.

An den Tagen 1 – 3 und 5 wurde der Mediumüberstand beprobt und die Leberenzymaktivitäten sowie Albumin- und Harnstoffgehalt gemessen (siehe Kap. 4.4.2 und 4.4.3). Vor jeder Probennahme wurde die Morphologie der Zellen im Lichtmikroskop überprüft und fotografisch dokumentiert.

## 4.4 Zellkultur und Zellfunktion

### 4.4.1 Aussaat und Kultur der Hepatozyten

Nach der Isolierung der Hepatozyten wurden die Zellen von acht explantierten Lebern und fünf Leberteileresektaten für sieben Tage kultiviert. Hierfür wurden zunächst 6 Well Zellkulturplatten (Falcon®) mit Kollagen (Kollagenlösung Typ I, vom Rattenschwanz, 1:40 in PBS verdünnt) beschichtet und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es wurden in je fünf Wells 1 Mio. Hepatozyten in 2 ml mod. Will E ausgesät. Das sechste Well diente als Negativkontrolle und wurde nur mit mod. Will E bestückt. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und Begasung mit 5 % Kohlenstoffdioxid bebrütet. Nach 4 – 8 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel unter dreimaligem Waschen mit PBS. Danach wurde alle 24 Stunden das Medium gewechselt und je einmal mit PBS gewaschen.

Je Isolierung wurden zwei Zellkulturplatten ausgesät, die jeweils für die Entnahme des Mediumüberstandes und für den Resazurin-Assay verwendet wurden. Der Mediumüberstand wurde an den Tagen 1 – 3, 5 und 7 beprobt und die Leberenzymaktivitäten sowie der Albumin- und Harnstoffgehalt gemessen (siehe Kap. 4.4.2 und 4.4.3). Vor jeder Probennahme wurde die Morphologie der Zellen im Lichtmikroskop überprüft und fotografisch dokumentiert. Der Resazurin-Assay wurde an den Tagen 2 – 5 und 7 durchgeführt (siehe Kap. 4.4.4).

### 4.4.2 Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe von Enzymaktivitäten

Die Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) kommen vorwiegend in Hepatozyten vor. Das Enzym Lactat-Dehydrogenase (LDH) findet sich in allen Zellen des Organismus wieder. Bei Beschädigung der Zellintegrität werden diese Enzyme freigesetzt und können im Mediumüberstand als Maß für die Zellviabilität bestimmt werden (Knobeloch, Ehnert et al. 2012).

Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellkultur wurde der Mediumüberstand abpipettiert und bei 7672 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Für die Messung wurden je 150 µl des zentrifugierten Mediumüberstandes bei 4 °C gelagert und innerhalb von ein bis drei Tagen verwendet. Die Bestimmung der Leberenzymaktivitäten erfolgte im Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH nach standardisierter Methode über eine fotometrische Messung. Für jede Zellkultur wurden Negativkontrollen aus reinem Zellkulturmedium mitgeführt und die Werte von den Ergebnissen der zugehörigen Proben abgezogen.

#### 4.4.3 Bestimmung der metabolischen Aktivität über die Messung der hepatozyten-spezifischen Produkte Harnstoff und Albumin

Als Endprodukt des Stoffwechsels stickstoffhaltiger Verbindungen wird Harnstoff spezifisch von Hepatozyten gebildet und in den Blutkreislauf abgegeben. Das Plasmaprotein Albumin wird ebenfalls spezifisch durch Hepatozyten synthetisiert. Das Vorkommen dieser Produkte im Mediumüberstand kann daher zur Beurteilung der metabolischen Aktivität der kultivierten Hepatozyten genutzt werden (Crane and Miller 1983; Knobloch, Ehnert et al. 2012).

Der Mediumüberstand wurde wie in Kap. 4.4.1 beschrieben beprobt. Nach der Zentrifugation wurden 150 µl des Überstandes bei 4 °C gelagert und der Harnstoffgehalt innerhalb von drei Tagen durch das Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH fotometrisch bestimmt. Der verbleibende Mediumüberstand wurde zunächst bei –20 °C gelagert und anschließend der Gehalt an humanem Albumin mit Hilfe eines ELISA Kits (Human Albumin ELISA Kit, Cell Culture Samples) bestimmt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach Gebrauchsanleitung des Herstellers. Die Titration der Proben ergab eine optimale Verdünnung von 1:100.

#### 4.4.4 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin-Assay

Resazurin ist ein nichttoxischer, blauer Farbstoff, der von lebenden Zellen durch Reduktion irreversibel in den pink fluoreszierenden Stoff Resorufin umgesetzt wird. Ein Teil des Resorufins wird anschließend weiter zu nicht fluoreszierendem Dihydroresorufin reduziert. Dieser Schritt ist reversibel und kann enzymatisch rückgängig gemacht werden. Die Menge des Gesamtresorufins wird anschließend fotometrisch bestimmt und dient als Maß der metabolischen Aktivität von Zellen *in vitro* (O'Brien, Wilson et al. 2000).

Die Inkubation der Zellen mit resazurinhaltigem Nährmedium und die fotometrische Messung des gebildeten Resorufins erfolgten in zwei getrennten Arbeitsschritten. Es wurden die Zellkulturen von fünf explantieren Lebern und vier Leberteilresektaten verwendet. Alle Arbeitsschritte fanden unter abgedunkelten Lichtverhältnissen statt. Bei jeder Inkubation wurde ein leeres Well als Negativkontrolle mitgeführt und später von den Ergebnissen der entsprechenden Proben abgezogen. Für den Inkubationsschritt wurden die Zellen zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend je Well 0,5 ml der Resazurin-Arbeitslösung aufgetragen. Die Inkubation erfolgte für 30 min im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung. Anschließend wurde die Resazurin-Arbeitslösung abgenommen und bei 7672 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstand wurde dann bis zur weiteren Verarbeitung bei –20 °C gelagert.

Für die Bestimmung des umgesetzten Resorufins musste zunächst das nicht fluoreszierende Dihydroresorufin wieder in Resorufin umgewandelt werden. Hierfür fand eine enzymatische Methode nach Donato et al. Anwendung (Donato, Gomez-Lechon et al. 1993). Die Proben wurden nach dem Auftauen im Verhältnis 1:8 mit mod. Will E ohne fetales Kälberserum (Fötale Bovines Serumalbumin, FBS) verdünnt und anschließend im Verhältnis 3:1 mit der Enzym-Arbeitslösung versetzt. Diese bestand aus 4800 U/ml Arylsulfatase und 600 U/l  $\beta$ -Glucuronidase in 0,1 M Natriumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 4,5. Der pH-Wert 4,5 entsprach dem Aktivitätsoptimum der Enzyme. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung). Anschließend wurde jeder Ansatz mit 1 Vol% 1 M Natriumhydroxidlösung versetzt, um den pH-Wert anzuheben. Dieser Schritt war notwendig, da das gebildete Resorufin im sauren Milieu nicht fluoresziert und fotometrisch nicht detektiert werden kann. Parallel wurde eine Standardreihe aus 1 mM Resorufin in mod. Will E ohne FBS angefertigt und ebenfalls der Enzymbehandlung unterzogen. Der niedrigste Standard wurde mit 0,02 mM und der höchste Standard mit 0,4 mM angesetzt. Für die fotometrische Messung wurden je 100  $\mu$ l der Proben und der Standardreihe in einer Doppelbestimmung in eine 96 Well Platte (96 Well Platte, Half Area, schwarz, fester Boden) überführt. Die anschließende Messung erfolgte bei 37 °C mit einer Exzitationswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (Donato, Gomez-Lechon et al. 1993; O'Brien, Wilson et al. 2000).

## 4.5 Isolierung und Anreicherung von Leberzellvorläufern

Gleichzeitig mit der Hepatozytenisolierung erfolgte die Isolierung potenzieller LcProg aus der NPC des jeweiligen Lebergewebes. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend über zwei verschiedene Methoden angereichert.

Der nach der ersten Zentrifugation der Hepatozyten erhaltene Überstand wurde zunächst erneut bei einer höheren Drehzahl zentrifugiert (350 x g, 5 min, 4 °C). Das daraus resultierende Pellet mit der NPC wurde anschließend in einer Enzymlösung aus 0,1 % Desoxyribonuklease und 0,02 % Protease in PBS für 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch diesen zweiten Verdauungsschritt sollte der beim Kollagenaseverdau entstandene Zelldebris beseitigt werden (He, Tan et al. 2004; Yovchev, Grozdanov et al. 2007). Der Verdauung wurde durch den Zusatz von 11 % FBS gestoppt und die Zellen anschließend zweimal in PBS gewaschen. Daraufhin wurde die Zellzahl mittels TBE (siehe Kap. 4.2) bestimmt und die für die Fluoreszenzfärbung benötigten Zellen abgenommen. Die an dieser Stelle entnommenen Zellen werden im Folgenden *NPC „vor Anreicherung“* genannt.

Die restlichen Zellen wurden zu gleichen Anteilen auf die Anreicherungsverfahren OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation und Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®) aufgeteilt. Die Schritte der Isolierung und Anreicherung der NPC auf LcProg sind in Abb. 4-4 noch einmal schematisch dargestellt.

### 4.5.1 OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation

Es wurde die NPC von acht explantierten Lebern und acht Leberteilresektaten mittels OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation auf potentielle LcProg angereichert. Von den acht Leberteilresektaten wurden die Zellen in fünf Fällen für die Zelltransplantation im Mausmodell und in drei Fällen für die Fluoreszenzfärbung verwendet.

Die OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation ist eine Anreicherungsmethode für LcProg, die auf der Größe und Dichte der Zellen basiert (Dolle, Best et al. 2010). Sie wurde, wie auch der Enzymverdau, aus den Vorversuchen im Rattenmodell übernommen (He, Tan et al. 2004; Yovchev, Grozdanov et al. 2007; Rohn, Schroeder et al. 2016). Das Verfahren beruht auf einem dreischichtigen, diskontinuierlichen Gradienten, der auf der Grundlage einer iodixanolhaltigen Lösung (OptiPrep™ Density Gradient Medium) erstellt wird. Dafür wurden zunächst 15 ml einer 20%igen OptiPrep™-Lösung in PBS mit 15 ml einer 14%igen Lösung überschichtet. Obenauf folgte eine dritte Schicht aus 4 ml einer 11%igen OptiPrep™-Lösung in mod. Will E mit den anzureichernden Zellen. Nach der Zentrifugation (350 x g, 10 min, 4 °C) wurde die Interphase zwischen der 11- und 14%igen Schicht abgenommen und für die Fluoreszenzfärbung (siehe Kap. 4.6) oder

zum Zwecke der Zelltransplantation (siehe Kap. 4.7.3) weiterverwendet. Diese Zellen werden im Folgenden als NPC „nach OptiPrep“ bezeichnet

#### 4.5.2 Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®)

Es wurde die NPC von sechs explantierten Lebern mit Hilfe des Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®) auf EpCAM-positive Zellen angereichert.

Nach dem Enzymverdau der NPC wurde ein Teil der Zellen für die Anreicherung potentieller Leberzellvorläufer mittels MACS® verwendet. Dieses Trennverfahren beruht auf etwa 50 nm großen, superparamagnetischen Mikropartikeln, den MicroBeads, die an Antikörper gebunden sind. Die Antikörper erkennen spezifisch Strukturen auf der Oberfläche von Zellen und binden so die MicroBeads an die entsprechende Zielzelle. Mit Hilfe eines permanenten Magnetfeldes und den mit ferromagnetischen Kugeln bestückten Trennsäulen können anschließend die markierten von den nicht markierten Zellen getrennt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine positive Selektion für den Oberflächenmarker EpCAM durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst einmal in MACS-Puffer gewaschen und dann in 100 µl MACS-Puffer je 1 Mio. Zellen resuspendiert. Anschließend wurde 1 µl Blockreagenz (FcR Blocking Reagent, human) je 1 Mio. Zellen hinzugegeben und die Probe kurz gemischt. Es folgte ein Färbeschritt mit MicroBead-markierten Antikörpern gegen EpCAM (CD326 (EpCAM) MicroBeads, human) in einer Verdünnung von 1:100 (Inkubation: 15 min, 4 °C, im Dunkeln). Die Zellen wurden anschließend erneut mit MACS-Puffer gewaschen und auf eine Trennsäule (LS Columns), die in einem Permanentmagneten (MidiMACS™ Separator) fixiert war, aufgetragen. Durch dreimaliges Spülen mit MACS-Puffer konnte die EpCAM-negative Zellfraktion gewonnen werden. Anschließend wurde die Trennsäule aus dem Magneten entfernt und die EpCAM-positive Zellfraktion mit MACS-Puffer ausgewaschen. Die Zellfraktionen wurden mittels TBE gezählt.

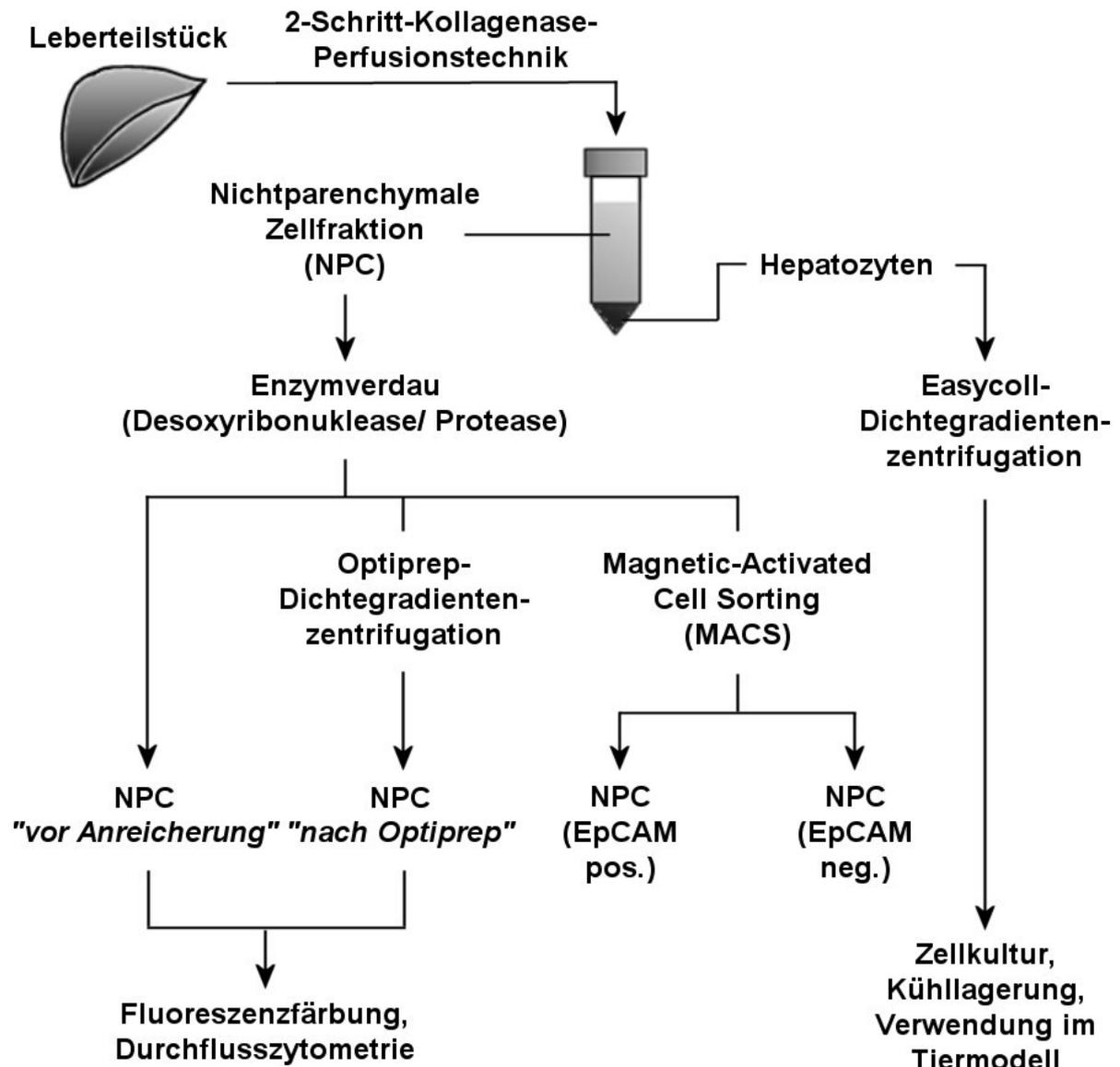


Abb. 4-4: Schema der Isolierung und Anreicherung potentieller Leberzellvorläufer in der Nichtparenchymalen Zellfraktion (NPC)

## 4.6 Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion

### 4.6.1 Die Oberflächenmarker EpCAM und CD45

Im Anschluss an die Isolierung und die Anreicherungsverfahren der NPC sollte der jeweilige Gehalt an LcProg gemessen werden. Die dabei erhaltenen Ergebnisse aus der NPC „nach OptiPrep“ wurden mit denen „vor Anreicherung“ verglichen.

Die Messung des Gehaltes an LcProg erfolgte über eine Färbung des Vorläuferzellmarkers EpCAM mit dem Fluorochrom-markiertem Antikörper CD326 (EpCAM)-PE. Parallel dazu wurden die in der NPC enthaltenen Leukozyten mit dem Panleukozytenmarker CD45 (CD45-FITC) angefärbt. In Vorbereitung der Färbungen wurden zunächst je Ansatz 0,5 Mio. Zellen in 100 µl MACS-Puffer resuspendiert. In jede Probe wurde dann 1 µl Blockreagenz (FcR Blocking Reagent, human) hinzugegeben und jeweils kurz gemischt. Daraufhin erfolgten Einzelfärbungen sowie eine Doppelfärbung mit den Antikörpern EpCAM-PE und CD45-FITC. Die Herkunft und eingesetzte Konzentration der genannten Antikörper ist in Tab. 4-2 aufgeführt. Nach anschließendem dreimaligem Waschen in FACS-Puffer wurde der relative Gehalt an EpCAM- oder CD45-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie an einem BD FACSCalibur™ Cell Analyzer bestimmt.

Das Färbeprotokoll ist schematisch in Abb. 4-5 dargestellt.

Bezeichnung des Antikörpers	Herkunft	Verdünnung	Inkubation
FcR Blocking Reagent human	Miltenyi	1:100	Gut mischen
CD326 (EpCAM)-PE, human	Miltenyi	1:100	30 min, 4 °C, i.D.
CD45-FITC, human	Miltenyi	1:100	30°min, 4 °C, i.D.
CD90-APC, human	Miltenyi	1:10	10 min, 2 – 8 °C, i.D.
CD133/1 (AC133)-APC, human	Miltenyi	1:8	10 min, 2 – 8 °C, i.D.
APC Ms Anti-Human CD56	BD Biosc.	1:20	10 min, 2 – 8 °C, i.D.
APC Ms Anti-Human CD54	BD Biosc.	1:20	10 min, 2 – 8 °C, i.D.
Ms IgG <sub>1</sub> Isotype Control-APC	R&D Syst.	1:20	10 min, 2 – 8 °C, i.D.

Tab. 4-2: Für die Fluoreszenzfärbung der Nichtparenchymalen Zellfraktion verwendete Antikörper

Miltenyi: Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach; BD Biosc.: BD Biosciences, Franklin Lakes, USA; R&D Syst.: R&D Systems, Minneapolis, USA; i.D.: im Dunkeln

#### 4.6.2 Die Oberflächenmarker CD90, CD133/1, CD56 und CD54

Bei der zuvor beschriebenen Fluoreszenzfärbung entstanden drei Zellfraktionen: eine EpCAM-positive, eine CD45-positive und eine EpCAM- und CD45-negative Zellfraktion. Diese wurden jeweils auf folgende Vorläuferzellmarker untersucht: CD90, CD133/1, CD56 und CD54. Hierfür erfolgte im Anschluss an die in Kapitel 4.6.1 beschriebene Färbung ein zusätzlicher Färbeschritt mit einem mit Allophycocyanin (APC) markiertem Antikörper gegen den jeweiligen Oberflächenmarker. Parallel dazu wurde eine Färbung mit einem Isotyp (Mouse IgG<sub>1</sub> Isotype Control-APC) als Negativkontrolle durchgeführt. Die Herkunft und eingesetzte Konzentration der genannten Antikörper ist in Tab. 4-2 aufgeführt. Das Färbeprotokoll ist schematisch in Abb. 4-5 dargestellt.

#### Färbeschema der NPC für die Durchflusszytometrie

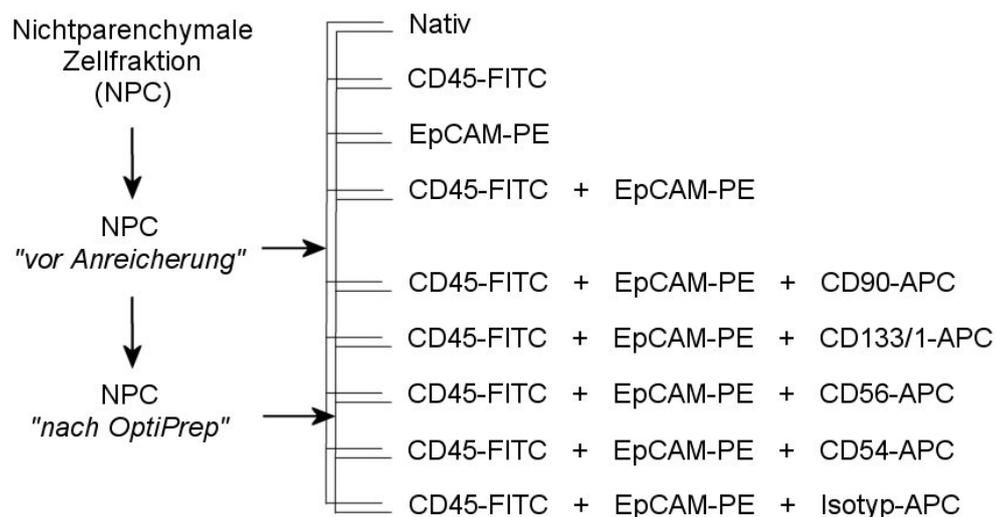


Abb. 4-5: Schematische Darstellung des Färbeprotokolls der Nichtparenchymalen Zellfraktion (NPC)

## 4.7 Tiermodell

### 4.7.1 Verwendete Tiere

Für die Entwicklung des Tiermodells wurden 33 Mäuse im Alter von 10 bis 16 Wochen vom Typ FOX CHASE SCID/beige<sup>®</sup>, C.B-17/lcrHsd-Prkdc<sup>scid</sup>Lyst<sup>bg-J</sup> (Harlan Laboratories, Indiana, USA) verwendet. Die SCID-Mutation (engl. *severe combined immunodeficiency*, SCID) ist gekennzeichnet durch das Fehlen von B- und T-Lymphozyten und bewirkt somit eine hochgradige Defizienz des erworbenen Teils des Immunsystems (Custer, Bosma et al. 1985). Die Kombination mit der Beige-Mutation führt darüber hinaus zu einer stark herabgesetzten NK-Zell-Funktion und ermöglicht somit die Xenotransplantation von humanen Zellen. Diese würden sonst durch die Aktivität der NK-Zellen lysiert werden (Roder and Duwe 1979; Meyerrose, Herrbrich et al. 2003).

Die Tiere wurden in Individuell Ventilierten Käfigen (engl.: *individually ventilated cages*, IVC) gehalten. Die Manipulation der Tiere sowie die Applikation von Medikamenten erfolgten in einer Sterilwerkbank (Lamin Air<sup>®</sup> HBB 2448).

Das gesamte, hier beschriebene Tierversuchsvorhaben wurde im Vorfeld vom Landesausschuss für Gesundheit und Soziales, Bereich Veterinärwesen genehmigt (G 0275/12, Humanisierte neo-hybride Leber).

### 4.7.2 Vorbehandlung der Tiere

Es erfolgte eine Einteilung der Mäuse in zwei Gruppen, von denen die Tiere der Gruppe 1 zwischen 24 und 12 Stunden vor der Zelltransplantation mit Monocrotalin (MCT) vorbehandelt wurden. MCT ist ein Pyrrolizidinalkaloid, welches die Hepatozytenproliferation hemmt und die Endothelzellen der Lebersinusoide schädigt. Die so behandelte Gruppe wird im Folgenden MCT-Gruppe genannt. Die Tiere der Gruppe 2 erhielten dagegen keine MCT-Vorbehandlung (SHAM-Gruppe). Auf diese Weise sollte untersucht werden, ob die Gabe von MCT kurz vor der Zelltransplantation zu einer Verbesserung der Repopularisierung führt.

In der MCT-Gruppe wurden drei Untergruppen und in der SHAM-Gruppe zwei Untergruppen zu je fünf Tieren mit Hepatozyten und LcProg aus je einem Leberteilresektat transplantiert. Zudem gab es je eine weitere Untergruppe, die dem gleichen Protokoll unterzogen wurde, jedoch keine Zellen erhielt. Diese diente jeweils als Negativkontrolle. Die Einteilung der Tiergruppen ist in Tab. 4-3 aufgeführt.

Die Applikation des MCT erfolgte am Tag vor der Zelltransplantation bzw. direkt nach der erfolgreichen Isolierung der zu transplantierenden Hepatozyten und LcProg. Es wurde eine 2%ige Monocrotalinlösung, pH 7,4, hergestellt und sterilfiltriert (Minisart<sup>®</sup> NML Sy-

ringe Filters, 0,2 µm). Diese Lösung wurde den Mäusen in einer Dosierung von 200 mg/kg intraperitoneal injiziert (Wu, Joseph et al. 2008).

Parallel mit der MCT-Applikation erhielten die Tiere in Vorbereitung auf die OP eine Injektion mit Enrofloxacin (Baytril® – Das Original 2,5 %, 10 mg/kg s.c.). Die Antibiose wurde bis zum Tag 8 nach der OP einmal täglich fortgesetzt.

Bezeichnung	Anzahl Tiere	MCT präOP	HcTx/LcProgTx	Grund der Leberteilresektion
I.R.1	5	ja	ja	Cholangiozelluläres Karzinom
I.R.2	5	ja	ja	Lebermetastasen
I.R.3	5	ja	ja	Cholangiozelluläres Karzinom
I.Kontr.	5	ja	nein	-
II.R.1	5	nein	ja	Cholangiozelluläres Karzinom
II.R.2	5	nein	ja	Cholangiozelluläres Karzinom
II.Kontr.	3	nein	nein	-

Tab. 4-3: **Gruppeneinteilung des Tiermodells**

MCT präOP: Vorbehandlung mit Monocrotalin; HcTx/LcProgTx: Leberzell- und Vorläuferzelltransplantation

#### 4.7.3 Präparation der zu transplantierenden Hepatozyten und Leberzellvorläufer

Die zu transplantierenden Hepatozyten wurden am Vortag des Eingriffs mit Hilfe der in Kapitel 4.2 beschriebenen 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik aus Leberteilresektaten isoliert. Parallel dazu wurden LcProg unter Anwendung der OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation aus der jeweiligen NPC angereichert.

Die Hepatozyten und LcProg wurden getrennt voneinander in dem Kühlmedium ChillProtec® plus über Nacht aufbewahrt. Hierfür wurden die Zellen bei einer Konzentration von 1 Mio./ml in ChillProtec® plus bei 4 °C liegend gelagert. Am Tag der Transplantation wurden die Zellen zentrifugiert, in nichtmodifiziertem Zellkulturmedium (Williams Medium E, ohne Phenolrot) resuspendiert und mit Hilfe des TBE gezählt. Die Zentrifugengeschwindigkeit betrug für Hepatozyten 50 x g und für LcProg 350 x g bei einer Zentrifugationszeit von 15 min.

Im Anschluss daran wurden je 2 Mio. Hepatozyten mit 0,5 Mio. LcProg in 0,4 ml Zellkulturmedium (Williams Medium E, ohne Phenolrot) resuspendiert und in 1 ml Einmalspritzen (1 ml Syringe, Luer-Lock™-Tip) aufgezogen. Bis zu ihrer Verwendung für die Zelltransplantation wurden die Spritzen bei 4 °C für maximal eine Stunde gelagert.

Bei der Transplantation wurden je Maus 0,2 ml der Zellsuspension in einer Spritze intrasplenal appliziert. Dies entsprach einer berechneten Zellzahl von 1 Mio. Hepatozyten und 0,25 Mio. LcProg je Tier. Sofort im Anschluss an die Transplantation wurden die verbleibenden Zellen in der jeweiligen Spritze erneut mittels TBE gezählt, um die tatsächlich applizierte Zellzahl und die Viabilität der applizierten Zellen zu bestimmen.

#### 4.7.4 Narkose und Operationstechnik

Am Tag nach der Zellisolierung wurde an je fünf Tieren nacheinander zunächst eine 50%ige partielle Hepatektomie (PH) und anschließend eine intrasplenale Zelltransplantation vorgenommen.

Die Narkose wurde mit einer kombinierten, intraperitonealen Injektion aus Ketamin (Ketamin 10 %, 90 mg/kg) und Medetomidin (Domitor<sup>®</sup>, 0,5 mg/kg) eingeleitet und dann über eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene<sup>®</sup> 100 % (V/V)) in reinem Sauerstoff aufrecht erhalten. Die Tiere wurden präoperativ antibiotisch mit Enrofloxacin (Baytril – Das Original 2,5 %, 10 mg/kg s.c.) und analgetisch mit Meloxicam (Melosolute 5 mg/ml, 1 mg/kg s.c.) behandelt. Diese Medikamente wurden, wie auch Ketamin und Medetomidin, vor der Injektion in 0,9%iger Natriumchloridlösung (NaCl 0,9 %, Isotonische Kochsalzlösung) verdünnt, um eine genaue Dosierung trotz des sehr geringen Körpergewichtes der Mäuse zu ermöglichen.

Vor der Operation wurden die Tiere im Bereich des Abdomens geschoren und mit Klebeband (Durapore<sup>™</sup> 2,5 cm) auf einer sterilen und beheizten Operationsunterlage (Abdecktuch, 3-lagig ; Wärmematte, HK5510) befestigt. Die Augen der Mäuse wurden durch eine Salbe (Bepanthen<sup>®</sup> Augensalbe) vor mechanischen und optischen Schäden während der Narkose geschützt.

Der Eingriff fand unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Leica M651) statt. Zunächst wurde eine mediane Laparotomie vom Processus xyphoideus bis etwa auf Höhe der Harnblase durchgeführt. Die Wundränder wurden mit Wundhaken (Briefklammern, autoklaviert) seitlich fixiert und das Xyphoid mit Hilfe einer Moskito-Klemme nach kranial verlagert. Durch vorsichtige Manipulation mit angefeuchteten Stieltupfern (Assistant<sup>®</sup> Wattestäbchen) wurde der linke laterale Leberlappen dargestellt und mit feuchten Kompressen (Charité Vlieskompressen) fixiert. Anschließend wurde der Leberlappen an seiner Basis ligiert (Seide, nicht resorbierbar, geflochten, 7-0) und mit einer mikrochirurgischen Schere abgetrennt. Nach der Blutungskontrolle erfolgte die Resektion des inferioren rechten Leberlappens unter der gleichen Vorgehensweise. Bei der Maus entspricht der linke laterale Leberlappen  $34,4 \% \pm 1,9 \%$  und der inferiore rechte Leberlappen  $14,7 \% \pm 1,4 \%$  des gesamten Lebervolumens (Martins, Theruvath et al. 2008). Zusammen ergibt ihre Resektion somit eine etwa 50%ige partielle Hepatektomie.

Direkt im Anschluss an die Leberlappenresektionen erfolgte die Zelltransplantation. Hierfür wurde der kaudale Milzpol aus dem Abdomen vorgelagert und mit einem Microgefäßclip fixiert. Die jeweilige Spritze mit der Zellsuspension wurde mit einer 27G Kanüle (Microlance™ 3) versehen und durch vorsichtiges Schwenken in der Hand erwärmt und durchmischt. Anschließend wurden 0,2 ml der Zellsuspension langsam in den kaudalen Milzpol injiziert. Nach dem Entfernen der Kanüle erfolgte eine Blutstillung durch Kompression und dem Einbringen eines resorbierbaren Gelatine-Schwammes (Gelita-Tampon). Vor dem Verschluss der Bauchdecke wurden 0,5 ml erwärmte NaCl 0,9% in die Abdominalhöhle gegeben. Die Bauchwand wurde fortlaufend mit resorbierbarem Nahtmaterial (Prolene\* 6-0) verschlossen. Die Hautnaht erfolgte ebenfalls fortlaufend mit PDS\*II 4-0 Ethicon.

Postoperativ wurde die Wirkung des Medetomidins durch Atipamezol (Antisedan®), 0,6 mg/kg i.p.) antagonisiert und die Aufwachphase unter Rotlichtbestrahlung überwacht. Das Trinkwasser wurde am Tag der Operation und im Anschluss für drei Tage mit Metamizol (Novaminsulfon 500 mg Lichtenstein, 8 mg/ml) versetzt.

#### 4.7.5 Postoperativer Verlauf

Die Tiere wurden postoperativ anhand der zuvor festgelegten Kriterien eines *score sheets* (siehe Anhang 11.2) überwacht und nach 15 Tagen für die Probenentnahme finalisiert. Wurden die Kriterien des *score sheets* während dieser 15 Tage überschritten, erfolgten Finalisierung und Probenentnahme an dem entsprechenden Tag.

Das Behandlungsschema der Mäuse über den Versuchszeitraum von 15 Tagen ist in Tab. 4-4 aufgeführt.

Für die Finalisierung wurden die Mäuse zunächst wie in Kapitel 4.7.4 beschrieben narkotisiert und in Rückenlage fixiert. War ein ausreichend tiefes Narkosestadium erreicht, wurde der Brustkorb unter Schonung des Zwerchfells median eröffnet und die Aorta thoracica mit einer Irisschere durchtrennt. Das sich im Brustkorb sammelnde Blut wurde dann mit einer Einmalspritze (Omnifix-F 1 ml) aufgesogen und in ein Serumröhrchen (Serum-Monovette 1,2 ml) überführt. Von den nach der PH verbleibenden Leberlappen wurde der große mediane Leberlappen in 4%ige Formalinlösung (Formaldehydlösung 4 %, phosphatgepuffert) gegeben. Die verbleibenden kleinen rechten und kaudalen Leberlappen wurden zu gleichen Teilen auf drei Kryokonservierungsgefäße (CryoPure Gefäß, 1,6 ml, weiß) aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Die Weiterverarbeitung der Proben ist in den Kapiteln 4.8.2 und 4.8.3 beschrieben.

Behandlung	Tag -1	Tag 0	Tag 1 – 2	Tag 3	Tag 4 – 8	Tag 9 – 15
MCT	X	-	-	-	-	-
PH und ZellTx	-	X	-	-	-	-
Enrofloxacin	X	X	X	X	X	-
Meloxicam	-	X	X	-	-	-
Metamizol	-	X	X	X	-	-
NaCl 0,9 %	-	X	X (b.B.)	X (b.B.)	-	-
Gewicht und <i>score sheet</i>	X (2x/d)	X (2x/d)	X (2x/d)	X (2x/d)	X (2x/d)	X (1x/d)

Tab. 4-4: **Behandlungsschema der Mäuse über den gesamten Versuch**

MCT: Monocrotalin; PH: Partielle Hepatektomie; ZellTx: Hepatozyten- und Leberzellvorläufertransplantation; Enrofloxacin: Baytril – Das Original 2,5 %, 10 mg/kg s.c.; Meloxicam: Melosolute 5 mg/ml, 1 mg/kg s.c.; Metamizol: Novaminsulfon 500 mg Lichtenstein, 8 mg/ml ins Trinkwasser; NaCl 0,9 %: 0,9%ige Natriumchloridlösung, 0,5 ml/Maus s.c.; b.B.: bei Bedarf; 2x/d: zweimal täglich; 1x/d: einmal täglich.

## 4.8 Nachweis der Repopularisierung

Die Weiterverarbeitung und Messung der Proben aus dem Tiermodell erfolgte im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit durch Tim Schmidt (siehe Kapitel 4.10 Beteiligte Personen). Die Methoden werden folgend zusammenfassend dargestellt.

### 4.8.1 Nachweis des humanen Serumalbumins im Mäuseserum

Das bei der Finalisierung der Tiere gewonnene Blut wurde maximal eine Stunde nach der Entnahme zentrifugiert (10 min, 1915 x g, 22°C), das Serum abgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

Der Nachweis von humanem Serumalbumin wurde mit Hilfe eines ELISA kits (Human Albumin ELISA Kit, Plasma, Serum Samples) nach Gebrauchsanleitung durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit den unverdünnten Proben sowie bei einer Verdünnung von 1:5000.

### 4.8.2 Immunhistologische Untersuchung der Mausleber auf humanes Albumin

Die Organproben der Mausleber wurden nach 24 bis 48 Stunden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Es wurden Schnitte von 2 µm Dicke angefertigt und diese mit Antikörpern gegen humanes Albumin (Rabbit polyclonal Anti-Human Serum Albumin antibody (ab2406)) immunhistologisch gefärbt. Bei jeder Färbung wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) aus humanem Lebergewebe mitgeführt. Das Lebergewebe der Kontrolltiere (ohne Zelltransplantation) diente ebenfalls als Negativkontrolle. Nach der Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit IgG (HRP), (ab6721)) wurde ein Streptavidin-HRP-Konjugat angelagert und dieser mit Diaminobenzidin sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin. Ein ausführliches Protokoll ist in Tab. 4-5 aufgeführt.

Hepatozyten, die für humanes Albumin (hAlb) positiv waren, färbten sich im Zytoplasma braun. Murine Hepatozyten wiesen dagegen keine oder eine leicht bläuliche Färbung auf. Die Einteilung erfolgte in „positiv“ oder „negativ“. Es wurden nur solche Präparate als „positiv“ gewertet, die mehrfach Zellen mit braunem Zytoplasma und einem hepatozytärem Phänotyp in der Nähe von Gefäßen aufwiesen. Diese Zellen wurden als erfolgreiche Popularisierung der Mausleber durch humane Hepatozyten angesehen. Präparate, die auch nach wiederholten Färbungen fraglich positiv blieben, wurden als „negativ“ gewertet.

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Beschreibung</b>
Deparaffinisierung	2 µm dicke Präparate 20 min in Xylol, 10 min in reinen Ethanol, je 5 min in 96%igen, 70%igen, 50%igen Ethanol und anschließend 5 min in destilliertes Wasser geben
Antigen Retrieval	Präparate 25 min bei 95 °C in 1%igen Zitratpuffer (Citrates Buffer, pH 6.0) im Druckkochtopf kochen, anschließend kurz mit PBS abspülen
Peroxydaseblock	Präparate 45 min mit 3 % Wasserstoffperoxyd-Lösung (Hydrogen peroxide solution) bei Raumtemperatur inkubieren, danach abklopfen
Blockierlösung	Sofort im Anschluss Blockierlösung für 90 min bei Raumtemperatur auf die Schnitte geben, danach abklopfen Blockierlösung: PBS mit 5 % FBS, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % Gelatine, 0,05 % Twen 20
Avidin-/Biotin-Block	Je ein Tropfen der beiden Reagenzien auf jeden Schnitt geben, 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, danach abklopfen
Primärantikörper	Anti-Human Serum Albumin antibody (ab2406) in Konzentration 1:1000 auf die Präparate geben, Inkubation bei Raumtemperatur für 2 Stunden in humider Kammer Positivkontrolle: humane Leber, Negativkontrolle: humane Leber ohne Primärantikörper
Waschen	Präparate mit PBS abspülen, dann in PBS geben, für 3x 5 min
Sekundärantikörper	Goat Anti-Rabbit IgG (HRP), (ab6721) in Konzentration 1:500 auf die Präparate geben, Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten in humider Kammer, danach erneut waschen
Diaminobenzidin (DAB+, Liquid)	DAB+ für 30 sek bis 2 min auf die Präparate geben (optische Farbkontrolle) und danach mit destilliertem Wasser abspülen, Präparate kurz in destilliertes Wasser eintauchen
Gegenfärben mit Hämatoxylin	Färben der Präparate mit Hämatoxylin für 1 min, danach mit lauwarmem Wasser abspülen und in destilliertes Wasser überführen
Eindeckeln	Präparate mit Aquatex® eindeckeln

Tab. 4-5: Immunhistologie der Mausleber, Anti-Albumin-Färbung

#### 4.8.3 Molekularbiologische Untersuchung der Mausleber auf humanes und murines Albumin sowie humanspezifische Alu-Sequenzen

Das Lebergewebe der behandelten Tiere wurde mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf das Vorkommen von Ribonukleinsäure (RNS)-Sequenzen für humanes und murines Albumin untersucht. Hierbei diente jeweils humanes oder murines Lebergewebe als Positiv- bzw. Negativkontrolle.

Aus den kryokonservierten Proben des kleinen rechten und des kaudalen Leberlappens wurde zunächst die RNS unter Verwendung von Trizol isoliert. Die Reinheit der Proben wurde mit Hilfe eines Spektrofotometers (NanoDrop™ 1000, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) überprüft und die erhaltene RNS unter Anwendung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) in Desoxyribonukleinsäure (DNS) umgeschrieben. Die Amplifikation der DNS erfolgte durch den Veriti® 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA) unter Verwendung der Primer für humanes und murines Albumin. Der Ansatz des Master Mixes, das PCR-Profil sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 4-6 aufgeführt.

Das PCR-Produkt und 5 µl des DNA O'RangeRuler 20 bp (Life Technologies, Carlsbad, USA) wurden auf ein 4%iges Agarose-Gel, welches Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen und bei 100 Volt aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert.

Humanspezifische Alu-Sequenzen (AluS) sind sich häufig wiederholende Abschnitte auf der DNA des Menschen, die eine Identifikation von humanem Gewebe mit hoher Sensitivität ermöglichen (Schneider, Osl et al. 2002).

Hierfür wurde parallel zur RNS-Isolierung an den gleichen Leberproben eine Isolierung der genomischen DNS unter Verwendung des DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Venlo, Niederlande) durchgeführt. Die Reinheit der Proben wurde mit Hilfe des Spektrofotometers überprüft und anschließend eine Amplifikation durchgeführt. Der Ansatz des Master Mixes, das PCR-Profil sowie die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 4-7 aufgeführt. Die weiteren Schritte erfolgten analog zu dem oben aufgeführten Nachweis von humanem und murinem Albumin.

<b>Master Mix Ansatz</b>			
Reagenzien	Konzentration	Hersteller	
DEPC-behandelt. Wasser		AppliChem, Illinois Tool Works Inc., USA	
10x PCR Buffer	1x	invitrogen, Life Technologies, USA	
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1 mM	invitrogen, Life Technologies, USA	
10 mM dNTPs	250 µM	invitrogen, Life Technologies, USA	
5 µM Forward Primer	0,25 µM	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin	
5 µM Reverse Primer	0,25 µM	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin	
500 U Taq Polymerase	1,25 U	invitrogen, Life Technologies, USA	
cDNA aus Umschreibung	<1000 ng		
<b>Humanes Albumin</b>			
	Forward Primer:	5' - TGCTTGAATGTGCTGATGACAGGG	
	Reverse Primer:	5' - AAGGCAAGTCAGCAGGCATCTCAT	
Modifiziert nach (Joshi, P et al. 2012)			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	45 s	25
Primerannealing	59°C	je 15 s	
Elongation	72°C	30 s	
terminale Elongation	72°C	5 min	1
Abkühlen	4°C	-	1
<b>Murines Albumin</b>			
	Forward Primer:	5' - TACAGCGGAGCAACTGAAGA	
	Reverse Primer:	5' - TTGCAGCACAGAGACAAGAA	
Modifiziert nach (Azuma, Paulk et al. 2007)			
Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	45 s	25
Primerannealing	57°C	je 30 s	
Elongation	72°C	45 s	
terminale Elongation	72°C	5 min	1
Abkühlen	4°C	-	1

Tab. 4-6: PCR-Profil für den Nachweis von humanem und murinem Albumin

<b>Master Mix Ansatz</b>			
Reagenzien	Konzentration	Hersteller	
DEPC-behandelt. Wasser		AppliChem, Illinois Tool Works Inc., USA	
10x PCR Buffer	1x	invitrogen, Life Technologies, USA	
50 mM MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	invitrogen, Life Technologies, USA	
10 mM dNTPs	250 µM	invitrogen, Life Technologies, USA	
5 µM Forward Primer	0,25 µM	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin	
5 µM Reverse Primer	0,25 µM	TIB Molbiol Syntheselabor, Berlin	
500 U Taq Polymerase	1,25 U	invitrogen, Life Technologies, USA	
gDNA	10 ng		
<b>Humanspezifische Alu-Sequenzen</b>	Forward Primer:	5' -GGCGCGGTGGCTCACG	
	Reverse Primer:	5' -TTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTC	
	Modifiziert nach (Azuma, Paulk et al. 2007)		
<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>	<b>Zyklen</b>
initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	30 s	20
Primerannealing	63°C	je 1 min	
Elongation	72°C	1 min	
terminale Elongation	72°C	10 min	1
Abkühlen	4°C	-	1

Tab. 4-7: PCR-Profil für den Nachweis humanspezifischer Alu-Sequenzen

#### 4.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programmes *Prism6 for MacOS X, Version 6.0c* (GraphPad Software Inc.). Welche Tests für die jeweiligen Ergebnisse verwendet wurden, ist in Tab. 4-8 aufgeführt.

	Statistische Auswertung
<b>Hepatozytenisolierung</b>	
Vgl. Zirr, PSC und LTRes: Viabilität und Zellzahl	Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison test
Korrelation Alter, MELD, Viabilität und Zellzahl	Pearson correlation coefficients (Zirr, LTRes); nonparametric Spearman correlation (PSC)
<b>Hepatozytenkultur (Mediumparameter)</b>	
Vgl. Zirr, PSC und LTRes: je Tag und je Parameter	Repeated Measured two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test
Vgl. Kulturtage: je Zirr, PSC, LTRes und je Parameter	Friedman test, Dunn's multiple comparisons test
Vgl. Kulturtage: je einzelne Leber und je Parameter	Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparisons test
<b>Hepatozytenkultur (Resazurin)</b>	
Vgl. Kulturtage: je für Expl und LTRes	Repeated Measured two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test
Vgl. Expl und LTRes: je Kulturtag	Repeated Measured two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test
<b>Cold Storage Versuch (Viabilität und Zellzahl)</b>	
Vgl. Zeitpunkte: je Expl, LTRes und je Medium	Repeated Measured two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test
Vgl. Medien: je Zeitpunkt und je Expl, LTRes	Repeated Measured two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test
Vgl. Expl, LTRes: je Zeitpunkt und je Medium	Ordinary two-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test

Tab. 4-8: Auflistung der verwendeten statistischen Tests

Vgl.: Vergleich; Zirr: explantierte Lebern mit Leberzirrhose; PSC: explantierte Lebern mit Primär Sklerosierender Cholangitis; LTRes: Leberteilresektate; Expl: explantierte Lebern

	<b>Statistische Auswertung</b>
<b>Cold Storage Versuch (Mediumparameter)</b>	
Vgl. Zeitpunkte: je Kulturtag und je Parameter für CP, CP+	Repeated Measured two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test
<b>Charakterisierung der NPC</b>	
Vgl. Zirr, PSC und LTRes: je vor und nach Anreicherung für EpCAM, CD45	Ordinary two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test
Vgl. Expl und LTRes: je vor und nach Anreicherung für CD90, CD133/1, CD54	Unpaired t test
<b>Anreicherungsverfahren</b>	
Vgl. vor und nach Anreicherung: je Zirr, PSC, LTRes für EpCAM, CD45	Wilcoxon matched-pairs signed rank test
Vgl. vor und nach Anreicherung: je Expl, LTRes für CD90, CD133/1, CD54	Wilcoxon matched-pairs signed rank test
<b>Mausmodell</b>	
Korrelation MCT- und SHAM-Gruppe, Viabilität, Zellzahl, Repopularisierung	nonparametric Spearman correlation
Vgl. pos. und neg.: je Nachweismethode für Viabilität und Zellzahl	Mann-Whitney test

Tab. 4-8 (fortgeführt): **Auflistung der verwendeten statistischen Tests**

Vgl.: Vergleich; Zirr: explantierte Lebern mit Leberzirrhose; PSC: explantierte Lebern mit Primär Sklerosierender Cholangitis; LTRes: Leberteilresektate; Expl: explantierte Lebern; NPC: Nichtparenchymale Zellfraktion; CP: ChillProtec®; CP+: ChillProtec® plus; CD: Cluster of Differentiation; MCT: Monocrotalin

#### 4.10 Beteiligte Personen

Die hier vorliegende Arbeit ist Teil eines größeren Projektes, welches in Kapitel 2.6 vorgestellt wurde (Neohybrides Lebertransplantat). Insbesondere die zu jeder Tages- und Nachtzeit durchgeführte Zellisolierung aus explantiertem Lebergewebe sowie die Durchführung der Zelltransplantation am Mausmodell verlangten mindestens drei parallel arbeitende Personen. Die Auswertung des Mausmodells wurde als eigenständige medizinische Doktorarbeit ausgelagert (siehe Tab. 4-9; Tim Schmidt). Die dargestellten Ergebnisse werden hier nur in Bezug auf die Eignung des Mausmodells ausgewertet. Die medizinische Promotion hingegen basiert auf der Etablierung geeigneter Nachweismethoden für humane Hepatozyten in muriner Leber, so dass es zu keiner wissenschaftlich inhaltlichen Überlappung kommt. Die an den Laborarbeiten beteiligten Personen werden in Tab. 4-9 aufgeführt und den jeweils durchgeführten Arbeiten zugeordnet.

Beteiligte Person	Kürzel	Funktion
Elisa Belaschk	EB	Approbierte Tierärztin, Promotion mit der hier vorgelegten Arbeit
Susanne Rohn	SR	Dipl.-Ing. Biotechnologie, Promotion über die Realisierung des NHLG am Rattenmodell (noch nicht eingereicht)
Ramla Mukiibi	RM	Approbierte Ärztin, Promotion über die Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion aus explantierter Leber mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (noch nicht eingereicht)
Peter Tang	PT	Staatlich geprüfter Techniker (Biotechnologie), Technischer Assistent
Tim Schmidt	TS	Approbierter Arzt, Promotion über die Etablierung von Methoden zur Auswertung des Mausmodells (noch nicht eingereicht)

Tab. 4-9: An den Laborarbeiten beteiligte Personen und deren Funktion

NHLG: Projekt Neohybrides Lebertransplantat

	<b>Beteiligte Personen (Kürzel)</b>
<b>Hepatozytenisolierung und –kultur</b>	
Isolierung und Aufreinigung von Hepatozyten	EB, RM, SR, PT
Betreuung der Zellkulturen	EB, RM
Messung und Auswertung von Enzymaktivitäten und Harnstoffgehalt im Medienüberstand	Labor Berlin (Messung), EB (Auswertung)
Messung und Auswertung des Gehaltes an humanem Albumin im Medienüberstand	PT (Messung), EB (Auswertung)
Durchführung und Auswertung des Resazurin-Assays	EB
Durchführung und Auswertung des Cold Storage Versuches	EB, RM (Durchführung), EB (Auswertung)
<b>Leberzellvorläuferisolierung und –charakterisierung</b>	
Isolierung und Aufreinigung von Leberzellvorläufern	EB, RM, SR, PT
Charakterisierung der NPC mittels Durchflusszytometrie	EB (Durchführung und Auswertung)
<b>Tiermodell</b>	
Durchführung der partiellen Hepatektomie und Zelltransplantation	EB (Operateurin), PT (unsterile OP-Assistenz)
Präparation der zu transplantierenden Hepatozyten und Leberzellvorläufer (zeitgleich mit der Zelltransplantation)	SR, TS
Prä- und postoperative Versorgung der Tiere	EB, SR, TS
Nachweis der Repopularisierung	TS, PT
<b>Statistische Auswertung</b>	
Statistische Auswertung	EB, SR

Tab. 4-9 (fortgeführt): **An den Laborarbeiten beteiligte Personen und deren Funktion**

Labor Berlin: Labor Berlin – Charité Vivantes GmbH, NPC: Nichtparenchymale Zellfraktion

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Hepatozytenisolierung aus explantierten Lebern und Leberteilresektaten

Es wurden Hepatozyten aus 23 explantierten Lebern und 14 Leberteilresektaten in einem Zeitraum von 30 Monaten isoliert. Die Lebertransplantationen wurden in 13 Fällen auf Grund einer Leberzirrhose durchgeführt, in sieben Fällen auf Grund einer PSC, in zwei Fällen lag ein ALV vor und in einem Fall ein Budd-Chiari-Syndrom. Die jeweilige Ursache der Leberzirrhose ist in Tab. 5-1 aufgeführt. Sechs von sieben PSC-Lebern wiesen zusätzlich eine sekundäre Leberzirrhose auf. Dies traf ebenfalls für die explantierte Leber des Budd-Chiari-Syndroms zu.

Das durchschnittliche Alter der Patienten mit Lebertransplantation betrug 53 Jahre  $\pm$  10 (Standardabweichung, SD). Der durchschnittliche *MELD Score* lag bei  $26 \pm 9$  SD. Die für die Zellisolierung abgetrennten Leberteilstücke hatten ein durchschnittliches Gewicht von  $29,0 \text{ g} \pm 8,6$  SD. Das Gewebe der explantierten Lebern fiel makroskopisch durch hochgradige, pathologische Abweichungen von der normalen Leberstruktur auf (Abb. 4-1). Insbesondere die PSC-Lebern zeigten makroskopisch Anzeichen einer Cholestase. Die zirrhotischen Lebern waren jeweils knotig verändert und von derber Konsistenz. Auf der Schnittfläche waren die fibrotischen Septen gut erkennbar. Steatotische Veränderungen der Hepatozyten wurden in sechs von 23 explantierten Lebern festgestellt und betrafen jeweils weniger als 50 % der Hepatozyten.

Zwölf Hepatozytenisolierungen aus explantierten Lebern konnten als erfolgreich eingestuft werden. Bei drei Lebern war die Beurteilung einer erfolgreichen Isolierung nicht möglich, da keine Aufreinigung der Hepatozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt worden war. Acht Lebern erreichten die Kriterien für eine erfolgreiche Isolierung nicht. Hieraus ergab sich eine Erfolgsquote für die Hepatozytenisolierung aus explantierten Lebern von 12/20 bzw. 60 %. Eine Übersicht über alle durchgeführten Hepatozytenisolierungen ist in den Tab. 5-1 und 5-2 aufgeführt.

Die durchschnittliche Viabilität der Hepatozyten aus erfolgreich isolierten, explantierten Lebern ( $n = 12$ ) betrug  $79,5 \% \pm 1,3$  (Standardfehler, SEM). Sie betrug bei Zirrhose-Lebern  $80,1 \% \pm 2,7$  SEM ( $n = 7$ ) und bei PSC-Lebern  $79,3 \% \pm 3,3$  SEM ( $n = 4$ ). Die Anzahl viabler Hepatozyten pro 10 g Lebergewebe aus erfolgreich isolierten, explantierten Lebern variierte erheblich. Der Median lag bei 26,4 Mio. (5,0 bis 256,8 Mio.) Zellen. Aus Zirrhose-Lebern wurden 14,3 Mio. (5,0 bis 43,6 Mio.) und aus PSC-Lebern 85,3 Mio. (14,9 bis 256,8 Mio.) viable Hepatozyten pro 10 g Lebergewebe isoliert (Abb. 5-1).

Das Alter der Patienten mit einer Leberteileresektion betrug im Durchschnitt 61 Jahre  $\pm$  14 SD. Die für die Zellisolierung genutzten Leberteilstücke aus Leberteileresektaten hatten ein durchschnittliches Gewicht von 28,3 g  $\pm$  12,7 SD und wiesen makroskopisch eine physiologische Gewebestruktur auf. Nicht erfolgreiche Zellisolierungen aus Leberteileresektaten wurden nicht dokumentiert. Eine Ausnahme bildete LTRes\_10, bei der die NPC zur Vorläuferzellisolierung genutzt wurde.

Die Viabilität der isolierten Hepatozyten betrug im Mittel 85,1 %  $\pm$  1,8 SEM (n = 14) und der Median der Zellzahl je 10 g Lebergewebe lag bei 78,3 Mio. (14,4 bis 248,8 Mio.) Zellen (Abb. 5-1).

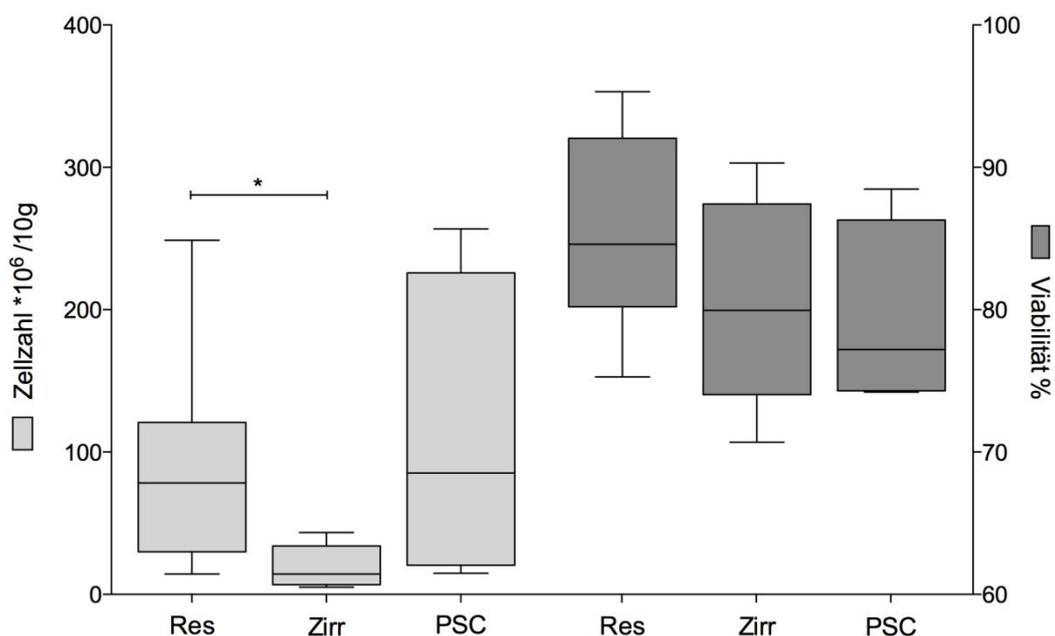


Abb. 5-1: **Viabilität und Zellzahl der erfolgreichen Hepatozytenisolationen aus explantierten Lebern und Leberteileresektaten**

Box-Whisker-Plot nach Tukey; Res: Leberteileresektate (n = 14); Zirr: Explantierte Lebern mit Leberzirrhose (n = 7); PSC: Explantierte Lebern mit Primär Sklerosierender Cholangitis (n = 4)

Die Viabilität der aus Zirrhose-Lebern, PSC-Lebern und Leberteileresektaten isolierten Hepatozyten unterschied sich nicht signifikant voneinander. Die Isolationen aus Zirrhose-Lebern zeigten tendentiell niedrigere Zellzahlen pro 10 g Lebergewebe, welche im Vergleich zu den Leberteileresektaten signifikant waren.

Das Alter der Patienten hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität oder die isolierte Zellzahl in den einzelnen Gruppen. Auch der *MELD Score* stand in keinem signifikanten Zusammenhang mit diesen Parametern.

<b>Übersicht der Zellisolierungen aus EXPLANTIERTEN LEBERN</b>					
<b>Bezeichnung</b>	<b>erfolgreich* ja/ nein</b>	<b>Grund der OLT</b>	<b>Gewicht Leber-TS in g</b>	<b>Zellzahl/10 g Leber in Mio. Zellen</b>	<b>Zellviabilität in %</b>
<b>Leberzirrhose</b>					
ExplZirr_1	Ja	Akut auf chronische C2-Zirrhose	17,4	5,0	82,1
ExplZirr_2	Ja	C2-Zirrhose	26,4	22,6	90,3
ExplZirr_3	Ja	C2-Zirrhose	34,2	34,0	70,7
ExplZirr_4	Ja	C2-Zirrhose	30,7	11,0	76,4
ExplZirr_5	Ja	C2-Zirrhose	40,3	6,9	74,0
ExplZirr_6	Ja	Kryptogene Zirrhose	22,8	43,6	80,0
ExplZirr_7	Ja	Kryptogene Zirrhose	22,5	14,3	87,4
ExplZirr_8	n. b.	C2-Zirrhose	24,0	30,2**	83,8**
ExplZirr_9	n. b.	C2-Zirrhose	31,9	21,5**	87,6**
ExplZirr_10	Nein	C2-Zirrhose	n. b.	<5 Mio.	80,9
ExplZirr_11	Nein	C2-Zirrhose	29,0	3,0	45,0
ExplZirr_12	Nein	C2-Zirrhose	21,0	4,2	80,0
ExplZirr_13	Nein	Kryptogene Zirrhose	33,2	3,0	53,0

Tab. 5-1: **Ergebnisse der Hepatozytenisolierungen aus explantierten Lebern**

\*: Viabilität  $\geq 70\%$  und  $\geq 5$  Mio. Hepatozyten/10 g Lebergewebe; OLT: Orthotope Lebertransplantation; Leber-TS: Leberteilstück; C2-Zirrhose: Alkoholinduzierte Leberzirrhose; PSC: Primär Sklerosierende Cholangitis; ALV: Akutes Leberversagen; n.b.: nicht beurteilbar; \*\*: Werte ohne Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation

<b>Übersicht der Zellisolierungen aus EXPLANTIERTEN LEBERN</b>					
<b>Bezeichnung</b>	<b>erfolgreich* ja/ nein</b>	<b>Grund der OLT</b>	<b>Gewicht Leber-TS in g</b>	<b>Zellzahl/10 g Leber in Mio. Zellen</b>	<b>Zellviabilität in %</b>
<b>Autoimmun bedingte Erkrankungen der Leber</b>					
ExpIPSC_1	Ja	PSC	40,6	14,9	74,2
ExpIPSC_2	Ja	PSC, Retransplantation	40,3	256,8	88,5
ExpIPSC_3	Ja	PSC, Retransplantation	14,7	133,0	74,6
ExpIPSC_4	Ja	PSC	31,8	37,5	79,8
ExpIPSC_5	Nein	PSC	39,7	1,5	60,0
ExpIPSC_6	Nein	PSC	30,2	3,3	84,3
ExpIPSC_7	Nein	PSC	39,6	196,0	60,1
<b>Sonstige Erkrankungen</b>					
ExpIALV_1	n. b.	ALV unklarer Genese	27,2	67,2**	91,0**
ExpIALV_2	Nein	ALV unklarer Genese	n. b.	n. b.	59,5
ExpIBuddCh	Ja	Budd Chiari Syndrom	12,1	30,2	75,5

Tab. 5-1 (fortgeführt): **Ergebnisse der Hepatozytenisolierungen aus explantierten Lebern**

\*: Viabilität  $\geq 70\%$  und  $\geq 5$  Mio. Hepatozyten/10 g Lebergewebe; OLT: Orthotope Lebertransplantation; Leber-TS: Leberteilstück; C2-Zirrhose: Alkoholinduzierte Leberzirrhose; PSC: Primär Sklerosierende Cholangitis; ALV: Akutes Leberversagen; n.b.: nicht beurteilbar; \*\*: Werte ohne Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation

<b>Übersicht der Zellisolierungen aus LEBERTEILRESEKTATEN</b>					
<b>Bezeichnung</b>	<b>Verwendung im Tiermodell</b>	<b>Grund der Leberteileresektion</b>	<b>Gewicht Leber-TS in g</b>	<b>Zellzahl/10 g Leber in Mio. Zellen</b>	<b>Zellviabilität in %</b>
<b>Unverändertes Lebergewebe</b>					
LRes_1	-	Lebermetastasen	24,3	130,0	81,8
LRes_2	-	Cholangiozelluläres Karzinom	26,0	117,7	75,3
LRes_3	-	Cholangiozelluläres Karzinom	14,0	105,2	93,6
LRes_4	-	Lebermetastasen	53,0	68,9	95,3
LRes_5	I.R.1	Cholangiozelluläres Karzinom	25,8	54,5	80,9
LRes_6	I.R.2	Lebermetastasen	10,5	248,8	85,1
LRes_7	I.R.3	Cholangiozelluläres Karzinom	44,7	34,6	75,5
LRes_8	II.R.1	Cholangiozelluläres Karzinom	14,6	28,9	78,2
LRes_9	II.R.2	Cholangiozelluläres Karzinom	31,8	164,8	84,0
LRes_10*	-	Lebermetastasen	20,0	-*	-*
LRes_11	-	Lebermetastasen	29,0	14,4	91,7
LRes_12	-	Lebermetastasen	21,0	87,6	81,9
LRes_13	-	Lebermetastasen	29,5	30,4	86,2
LRes_14	-	Lebermetastasen	23,8	104,0	88,7
LRes_15	-	Lebermetastasen	48,0	19,9	92,9

Tab. 5-2: **Ergebnisse der Hepatozytenisolierungen aus Leberteileresektaten (LRes)**

Leber-TS: Leberteilstück; \*: nur Isolierung der Leberzellvorläufer

## 5.2 Hepatozytenkultur und Bestimmung der metabolischen Aktivität

Es wurden alle erfolgreich aus explantierten Lebern isolierten Hepatozyten ausgesät und über drei bis sieben Tage in Kultur gehalten. Die Kulturbedingungen unterschieden sich dabei nicht von denen für Hepatozyten aus unverändertem Lebergewebe. Acht Zellkulturen aus explantierten Lebern wurden über sieben Tage fortgeführt und für Enzym- und Stoffwechselproduktanalysen genutzt (Kap. 5.2.1). Hierbei kam es lediglich in einem Fall ab dem dritten Tag zu einer verstärkten Granulation des Zytoplasmas und zur Desintegration der Zellwände, was hinweisend für ein Absterben der Zellen in Kultur ist (ExplPSC\_2). Die Hepatozyten der anderen explantierten Lebern bildeten eine über sieben Tage stabile Monolayerschicht, die sich lichtmikroskopisch nicht von den Zellkulturen der Leberteileresektate unterschied (Abb. 5-2).

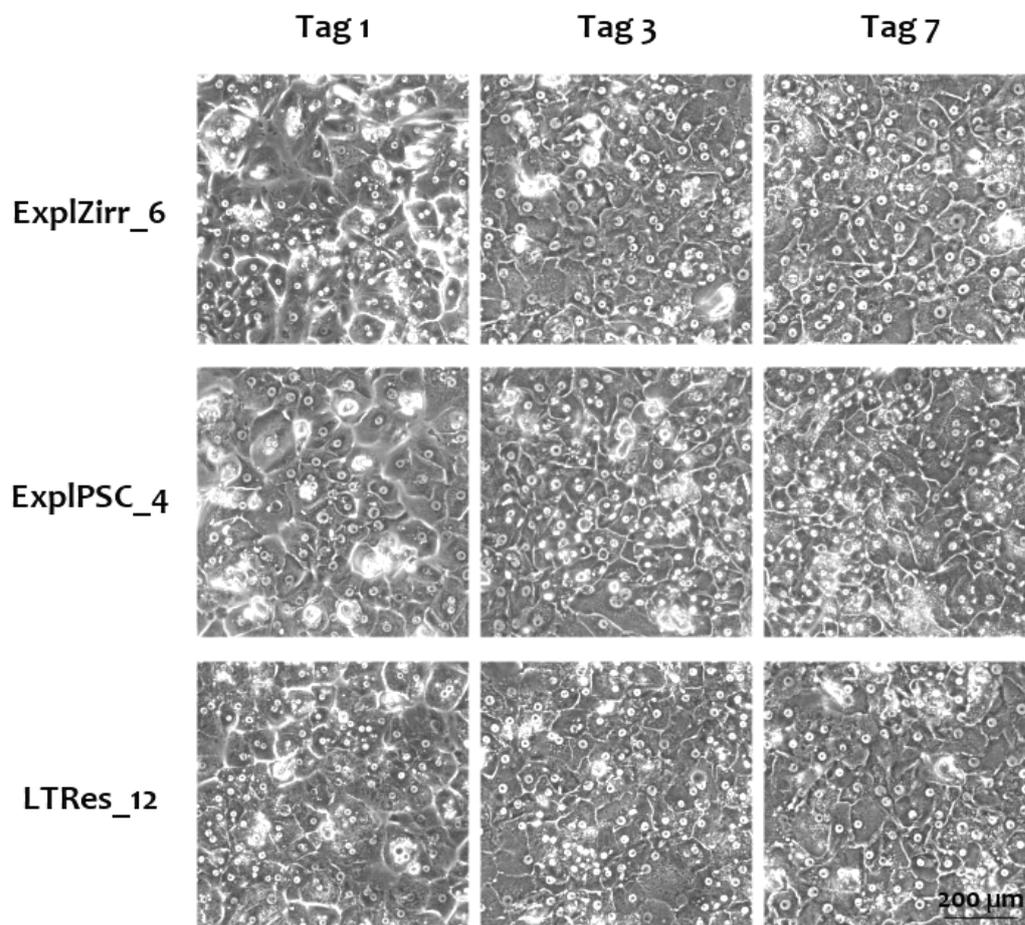


Abb. 5-2: Hepatozytenkultur aus zwei explantierten Lebern und einem Leberteileresektat (LTRes) an den Tagen 1, 3 und 7

ExplZirr: explantierte Leber mit Leberzirrhose; ExplPSC: explantierte Leber mit Primär Sklerosierender Cholangitis, Durchlicht, ungefärbt

### 5.2.1 Enzymaktivitäten und Stoffwechselprodukte im Mediumüberstand

Von den Hepatozytenkulturen aus acht explantierten Lebern und fünf Leberteileresektaten wurde an den Zellkulturtagen 1, 2, 3, 5 und 7 der Mediumüberstand beprobt. In diesem wurden die Enzymaktivitäten von AST (U/l), ALT (U/l) und LDH (U/l) sowie die Konzentration der Stoffwechselprodukte Harnstoff (mg/dl) und Albumin ( $\mu\text{g/ml}$ ) gemessen. Bei den explantierten Lebern handelte es sich um fünf Zirrhose-Lebern und drei PSC-Lebern.

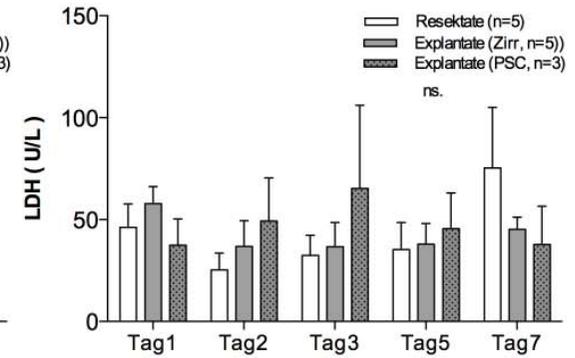
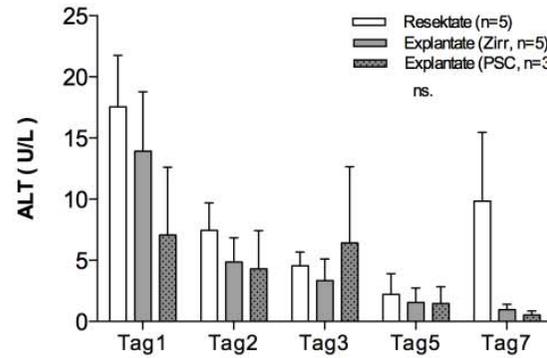
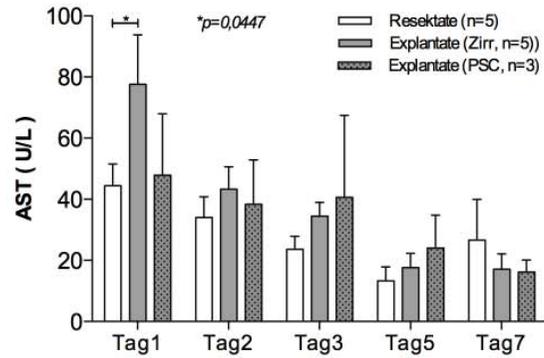
Bei zehn der insgesamt 13 Zellkulturen kam es von Tag 1 zu Tag 3 zu einer teils signifikanten Verringerung der Enzymaktivitäten, welche dann in den darauffolgenden Kulturtagen konstant blieben. Die anderen Zellkulturen zeigten von Beginn an gleichbleibende Enzymaktivitäten. Diese Beobachtung war nicht abhängig von der Herkunft der Zellkultur aus Zirrhose- oder PSC-Leber bzw. Leberteileresektat. Lediglich in der Kultur der PSC-Leber, welche auch lichtmikroskopische Veränderungen aufwies (ExplPSC\_2), wurden von Tag 1 zu Tag 3 signifikant ansteigende Enzymaktivitäten gemessen, die dann zu Tag 5 und Tag 7 wieder abfielen. Zwei von fünf Zellkulturen aus Leberteileresektaten zeigten an Tag 7 einen signifikanten Anstieg aller drei Enzymaktivitäten im Vergleich zu Tag 5. Dies war bei keiner der explantierten Lebern der Fall.

Mit Ausnahme von Tag 1 konnte an keinem der oben genannten Messtage ein signifikanter Unterschied der Enzymaktivitäten zwischen den Zellkulturen aus Leberteileresektaten, Zirrhose- und PSC-Lebern festgestellt werden. An Tag 1 wiesen die Zellkulturen aus explantierten Lebern mit Leberzirrhose eine signifikant höhere ALT-Konzentration auf als solche aus Leberteileresektaten ( $p = 0,0447$ ). Dieser Unterschied wurde durch die Messung der Enzyme AST und LDH nicht bestätigt (Abb. 5-3, oben).

Die Zellkultur aus ExplPSC\_2 wies ab Tag 3 und die Kultur aus ExplZirr\_5 ab Tag 5 einen nicht mehr messbaren Harnstoffgehalt auf. In den anderen Zellkulturen verhielten sich die gemessenen Stoffwechselprodukte ähnlich den Enzymaktivitäten, es wurde jedoch keine signifikante Veränderung an Tag 7 im Vergleich zu Tag 5 beobachtet.

An keinem der beprobten Kultivierungstage wurde ein signifikanter Unterschied in der Harnstoff- oder Albuminkonzentration des Mediumüberstandes zwischen den Zellkulturen aus Leberteileresektaten, Zirrhose- und PSC-Lebern gemessen. Jedoch konnten ab Tag 3 tendenziell höhere Harnstoff- und Albuminkonzentrationen für die Leberteileresektate beobachtet werden (Abb. 5-3, unten).

## Enzymaktivitäten



## Stoffwechselprodukte

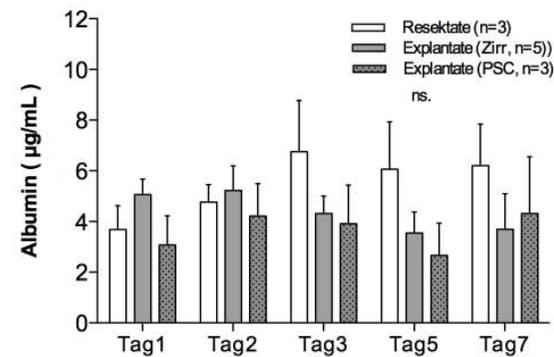
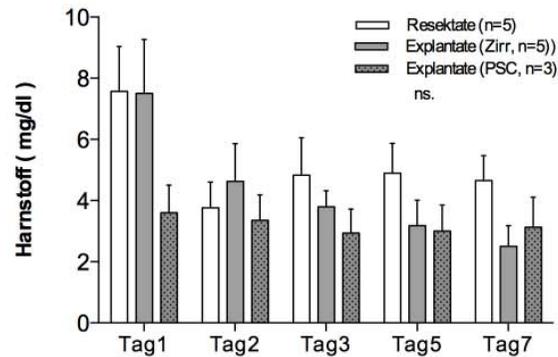


Abb. 5-3: Enzymwerte und Stoffwechselprodukte im Mediumüberstand im Verlauf der Zellkultur

Mittelwerte ± SEM; ns.: nicht signifikant

### 5.2.2 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Resazurin Assay

Der Resazurin-Assay wurde an der Hepatozytenkultur von fünf explantierten Lebern (drei Zirrhose-Lebern und zwei PSC-Lebern) und vier Leberteilresektaten durchgeführt. Es wurde das umgesetzte Resorufin an den Tagen 2, 3, 4, 5 und 7 in mM/l Resorufin bestimmt. Die Ergebnisse der explantierten Lebern werden hier zusammenfassend dargestellt, um eine statische Auswertung trotz geringer Anzahl der PSC-Lebern zu ermöglichen.

Die Zellkulturen der explantierten Lebern setzten an den verschiedenen Kulturtagen im Mittel zwischen  $0,63 \text{ mM/l} \pm 0,10 \text{ SEM}$  (Tag 2) und  $0,49 \text{ mM/l} \pm 0,09 \text{ SEM}$  (Tag 7) Resorufin um. Bei den Leberteilresektaten betrug der Mittelwert  $0,62 \text{ mM/l} \pm 0,14 \text{ SEM}$  (Tag 2) bis  $0,28 \text{ mM/l} \pm 0,05 \text{ SEM}$  (Tag 7) Resorufin. Die Konzentration des umgesetzten Resorufins unterschied sich zwischen beiden Gruppen an keinem der Tage signifikant.

Bei den Leberteilresektaten kam es an Tag 7 zu einem signifikanten Abfall des umgesetzten Resorufins im Vergleich zu Tag 2 ( $p = 0,001$ ). Dies wurde bei den Zellkulturen aus explantierten Lebern nicht beobachtet (Abb. 5-4).

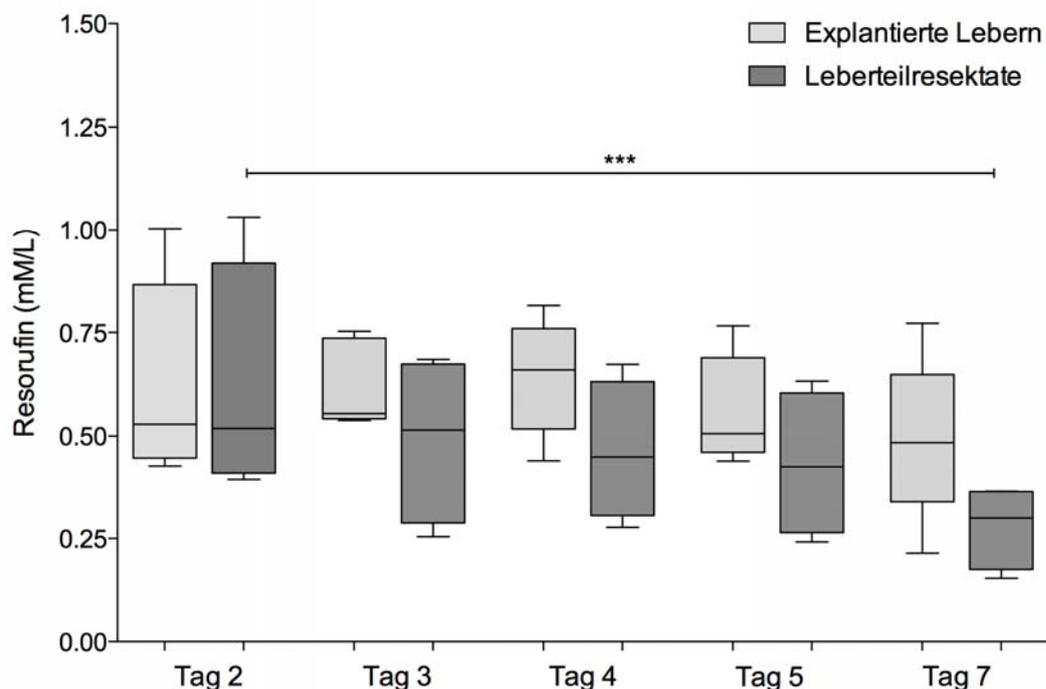


Abb. 5-4: **Konzentration des umgesetzten Resorufins im Verlauf der Zellkultur**

Vergleichende Darstellung explantierter Lebern ( $n = 5$ ) und Leberteilresektate ( $n = 4$ ) an den einzelnen Zellkulturtagen; Box-Whisker-Plot nach Tukey

### 5.3 Ergebnisse des *Cold Storage* Versuches

#### 5.3.1 Viabilität und relativer Zellzahlverlust der Hepatozyten nach Kühlung

Es wurden die Hepatozyten von vier explantierten Lebern (zwei Zirrhose-Lebern und zwei PSC-Lebern) und fünf Leberteileresektaten für 24 und 48 Stunden bei 4 °C in den Medien ChillProtec® (CP), ChillProtec® plus (CP+) und mod. Will E gelagert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden die Zellen mittels TBE erneut gezählt und die Ergebnisse mit denen vor der Kühlung verglichen. Die Zellzahl wurde dabei als relativer Zellzahlverlust in Prozent bezogen auf die ursprünglich zur Kühlung angesetzte Zellzahl angegeben.

Die mittlere Viabilität zum Zeitpunkt 0 h betrug 79,7 % ± 3,1 SEM für Hepatozyten aus explantierten Lebern bzw. 84,9 % ± 3,4 SEM für Hepatozyten aus Leberteileresektaten. In allen drei Medien kam es nach 24 h Kühlung zu einem deutlichen Absinken der Viabilität. Es wurden je nach Ansatz Verluste von 12,3 % ± 1,7 SEM (CP+, explantierte Lebern) bis zu 37,4 % ± 7,1 SEM (mod. Will E, Leberteileresektate) beobachtet. Mit Ausnahme des genannten niedrigsten Wertes war der Viabilitätsverlust für alle drei Medien sowohl bei explantierten Lebern als auch bei Leberteileresektaten signifikant.

Nach 48 h Kühlung sank die Viabilität der Hepatozyten in mod. Will E weiter ab während sie in den Medien CP und CP+ weitgehend konstant blieb. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Kühlung unterschieden sich die Viabilitäten der in mod. Will E gelagerten Hepatozyten signifikant von denen, die in CP oder CP+ gelagert wurden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kühlungsmedien CP und CP+ trat lediglich nach 48 h bei den Hepatozyten aus Leberteileresektaten auf ( $p = 0,049$ ). Das Medium CP+ bewirkte dabei eine höhere Viabilität der Zellen (Abb. 5-5, links).

Nach 24 h Kühlung kam es in allen drei Medien zu unerwartet hohen Zellzahlverlusten zwischen 31,7 % ± 1,4 SEM (CP, explantierte Lebern) und 49,0 % ± 6,3 SEM (CP+, Leberteileresektate). Dies galt vor allem für die Hepatozyten aus Leberteileresektaten, bei denen oft über die Hälfte der Zellen verloren ging. Nach 48 h Kühlung blieben die Zellzahlverluste in den Kühlungsmedien CP und CP+ weitgehend konstant. Analog zur Zellviabilität kam es bei dem Zellkulturmedium mod. Will E zu einem erneuten, hohen Zellzahlverlust nach 48 h (Abb. 5-5, rechts).

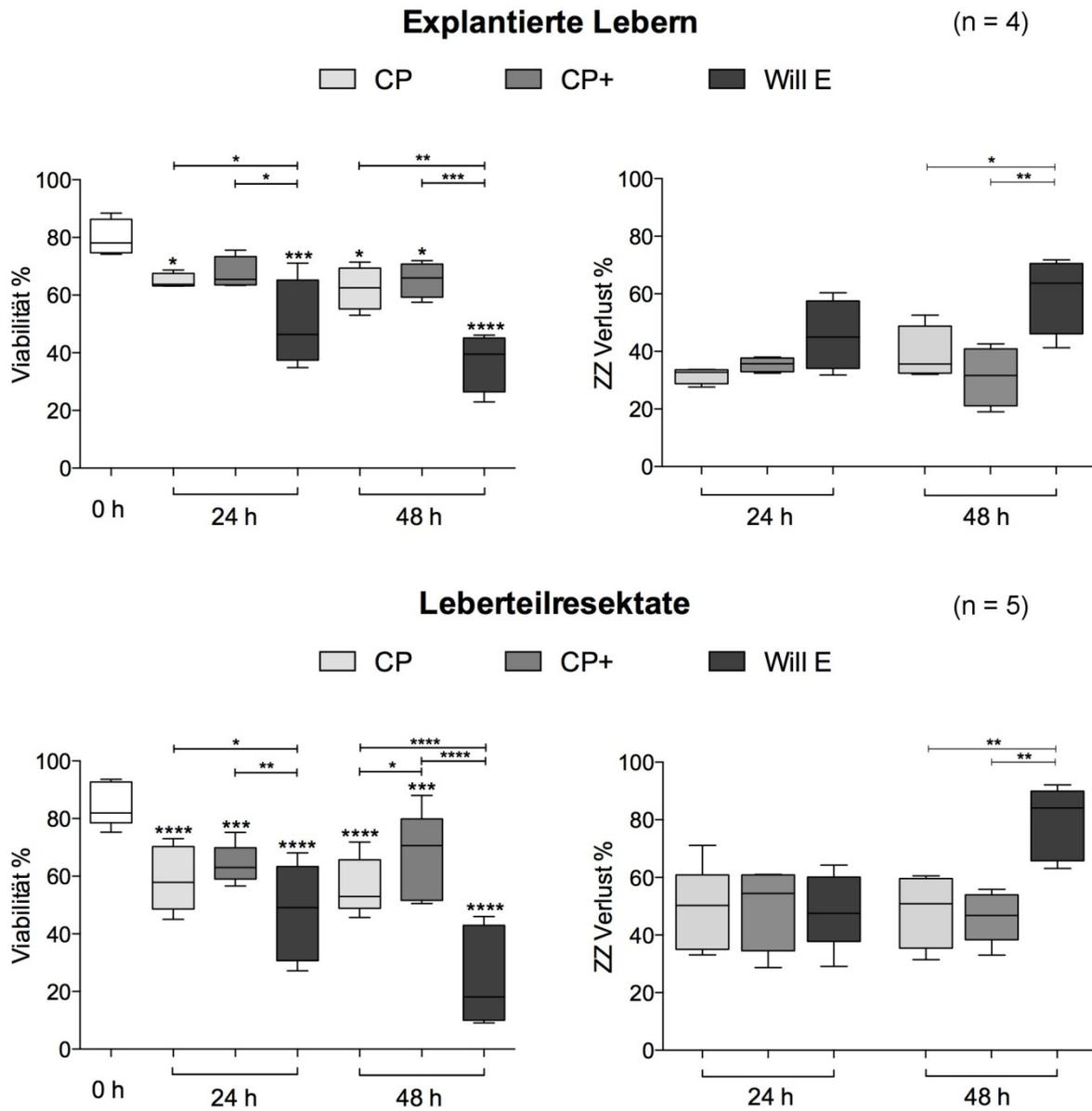


Abb. 5-5: Viabilität und Zellzahl der Hepatozyten im Cold Storage Versuch

Werte aufgeschlüsselt nach Art des Lebergewebes, Kühlagerungsmedium und Dauer der Kühlagerung: Die Signifikanzen direkt auf den Balken beziehen sich auf die Ausgangsviabilität bei 0 h. Box-Whisker-Plot nach Tukey; ZZ Verlust: Relativer Zellzahlverlust; CP: ChillProtec®; CP+: ChillProtec® plus; mod. Will E: modifiziertes William's Medium E

Im direkten Vergleich zwischen explantierten Lebern und Leberteileresektaten konnte an keinem der genannten Zeitpunkte (0 h, 24 h, 48 h) und für keines der genannten Medien (CP, CP+, mod. Will E) ein signifikanter Unterschied der Zellviabilität festgestellt werden (Abb. 5-6). Gleiches galt für den relativen Zellzahlverlust in Prozent (nicht dargestellt).

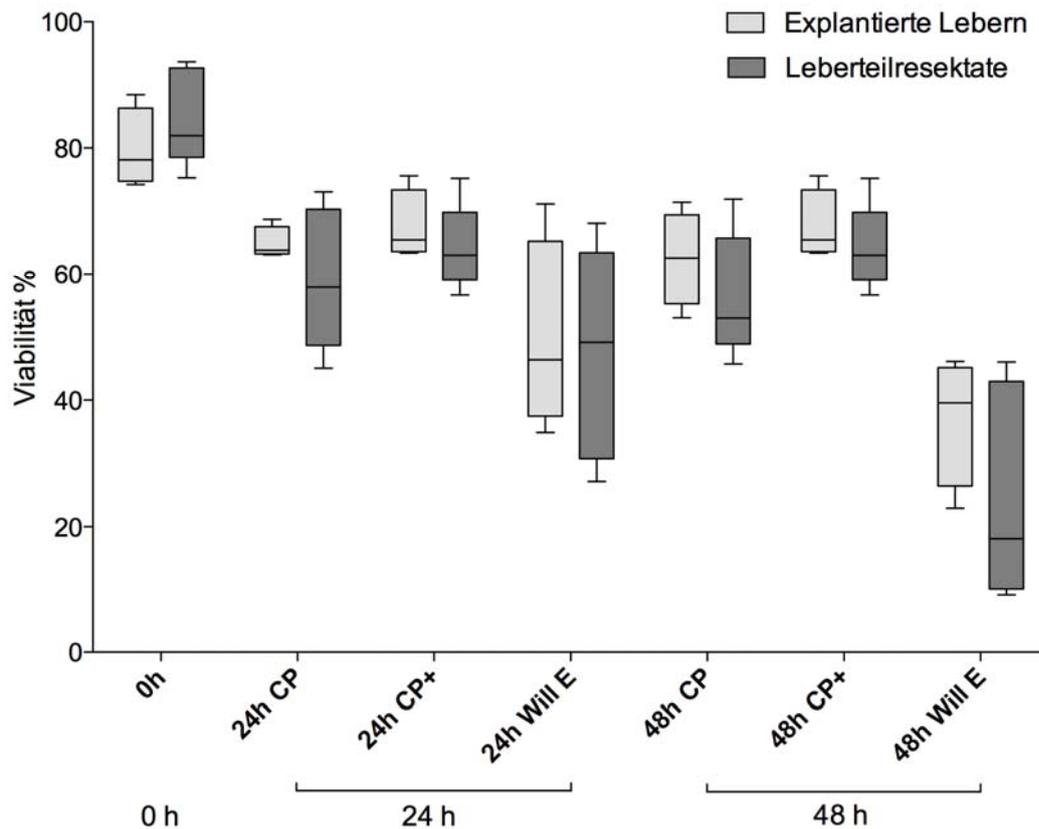


Abb. 5-6: **Viabilität der Hepatozyten vor und nach Kühlung**

Vergleichende Darstellung der Hepatozyten aus explantierten Lebern (n = 5) und Leberteileresektaten (n = 4) pro Zeitpunkt bzw. Lagerungsmedium. Box-Whisker-Plot nach Tukey; CP: ChillProtec®; CP+: ChillProtec® plus; Will E: modifiziertes William's Medium E

### 5.3.2 Zellkultur der Hepatozyten aus explantierten Lebern nach Kühlung

Die Hepatozyten der fünf explantierten Lebern wurden an den drei Zeitpunkten für die drei verschiedenen Kühlungsmethoden erfolgreich ausgesät und über fünf Tage in Kultur gehalten. Eine Ausnahme bildeten die Hepatozyten aus ExplPSC\_2, die ab dem dritten Tag deutliche sichtbare Anzeichen des Zelltodes aufwiesen. Dies betraf jedoch in gleichem Maße die zum Zeitpunkt 0 h ausgesäten Zellen und wurde nicht durch die Kühlung verursacht.

Durch die hohen Zellzahlverluste während der Kühlung konnten in vielen Fällen nur zwei Wells je Zeitpunkt und Medium ausgesät werden. Aus diesem Grund war eine statistische Auswertung der Messungen im Mediumüberstand nur für eine Leber (ExplZirr\_6) und für die Kühlungsmethoden CP und CP+ möglich.

Hier wurden am ersten Kulturtag nach 24 und 48 Stunden Kühlung signifikant erhöhte Enzymaktivitäten im Vergleich zu der frisch ausgesäten Zellkultur gemessen. An den weiteren Kulturtagen drehte sich dieses Verhältnis. Die frisch ausgesäten Zellkulturen wiesen höhere Enzymaktivitäten auf. Ein Unterschied zwischen den Kühlungsmethoden (CP bzw. CP+) oder der Dauer der Lagerung (24h bzw. 48h) war auf Grund des geringen Probenumfangs nicht feststellbar. Die zuvor gelagerten Hepatozyten produzierten in Kultur tendenziell weniger Harnstoff bzw. Albumin als die frisch ausgesäten Zellen. Dieser Unterschied war jedoch nur für die Harnstoffwerte und nur an zwei Tagen signifikant.

In Abb. 5-7 sind die Werte von ExplZirr\_6 vor und nach Lagerung in CP+ beispielhaft anhand von LDH und Harnstoff dargestellt.

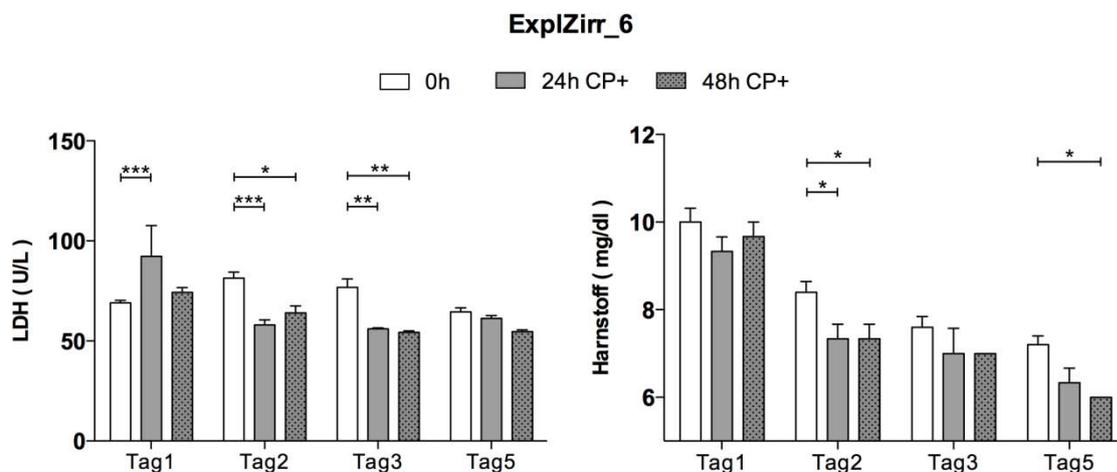


Abb. 5-7: **LDH und Harnstoff der Zellkultur aus einer Zirrhose-Leber (ExplZirr\_6)**

Mittelwerte  $\pm$  SEM vor und nach Kühlung in Chill Protec<sup>®</sup> plus (CP+) über 24 und 48 Stunden

## 5.4 Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion vor den Anreicherungsverfahren

### 5.4.1 Die Oberflächenmarker EpCAM und CD45

Die NPC von neun explantierten Lebern (davon vier Zirrhose-Lebern und fünf PSC-Lebern) und drei Leberteilresektaten wurde vor der Anwendung der Anreicherungsverfahren auf das Vorhandensein EpCAM- bzw. CD45-positiver Zellen untersucht.

Der mittlere Gehalt an EpCAM-positiven Zellen betrug in der NPC von Zirrhose-Lebern  $1,61 \% \pm 0,90$  SEM (Median: 0,86 %) und in der NPC von PSC-Lebern  $1,44 \% \pm 0,69$  SEM (Median: 0,93 %). Die NPC aus Leberteilresektaten enthielt im Mittel nur  $0,12 \% \pm 0,04$  SEM (Median: 0,13 %) EpCAM-positiver Zellen. Tendenziell ließen sich also mehr EpCAM-positiver Zellen in der NPC von explantierten Lebern nachweisen, jedoch waren die Unterschiede gegenüber den Leberteilresektaten nicht signifikant (Abb. 5-10).

Der prozentuale Anteil CD45-positiver Zellen in der NPC „vor Anreicherung“ betrug für die Zirrhose-Gruppe  $34,7 \% \pm 7,8$  SEM (Median: 29,9 %) und für die PSC-Gruppe  $60,7 \% \pm 6,3$  SEM (Median: 61,6 %). Die NPC der Leberteilresektate enthielt vor der Anreicherung  $52,4 \% \pm 14,9$  SEM (Median: 65,1 %) CD45-positiver Zellen. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant.

### 5.4.2 Die Oberflächenmarker CD90, CD133/1, CD54 und CD56

Anschließend wurden die Zellfraktionen EpCAM+/CD45-, EpCAM-/CD45- und EpCAM-/CD45+ von vier explantierten Lebern und drei Leberteilresektaten auf die parallele Expression der Oberflächenmarker CD90, CD133/1, CD54 und CD56 untersucht. Unter den explantierten Lebern befanden sich zwei Zirrhose-Lebern und zwei PSC-Lebern.

Trotz mehrfacher, erfolgreicher Etablierung an humanen Leukozyten konnte keine der gemessenen Proben mit dem Antikörper APC Ms Anti-Human CD56 angefärbt werden ( $je \leq 0,05 \%$ ). Dies traf auch für die Zellfraktion EpCAM-/CD45+ zu. CD56 ist jedoch auch ein anerkannter Marker der ebenfalls CD45-positiven NK-Zellen und hätte hier erwartungsgemäß nachgewiesen werden müssen (Hata, Zhang et al. 1990; Tsuchiya, Kamimura et al. 2009). Es wurde daher von einem systematischen Fehler bei der Färbung ausgegangen und die Ergebnisse von der Auswertung ausgeschlossen. Mögliche Gründe hierfür werden in Kap. 6.2 diskutiert.

### 5.4.3 Die Zellfraktion EpCAM+/CD45–

Die Charakterisierung der Zellfraktion EpCAM+/CD45– mittels Durchflusszytometrie war lediglich für die NPC von drei explantierten Lebern möglich. In den anderen Proben war der Gehalt EpCAM-positiver Zellen zu gering bzw. die gemessene Zellzahl zu niedrig um eine gesicherte Aussage zu treffen.

Alle Zellen der Fraktion EpCAM+/CD45– zeigten die gleichen Oberflächenmerkmale. Sie waren CD133/1-positiv sowie CD90– und CD54-negativ. Die Ergebnisse sind am Beispiel einer PSC-Leber (ExpIPSC\_7) in Abb. 5-8 dargestellt.

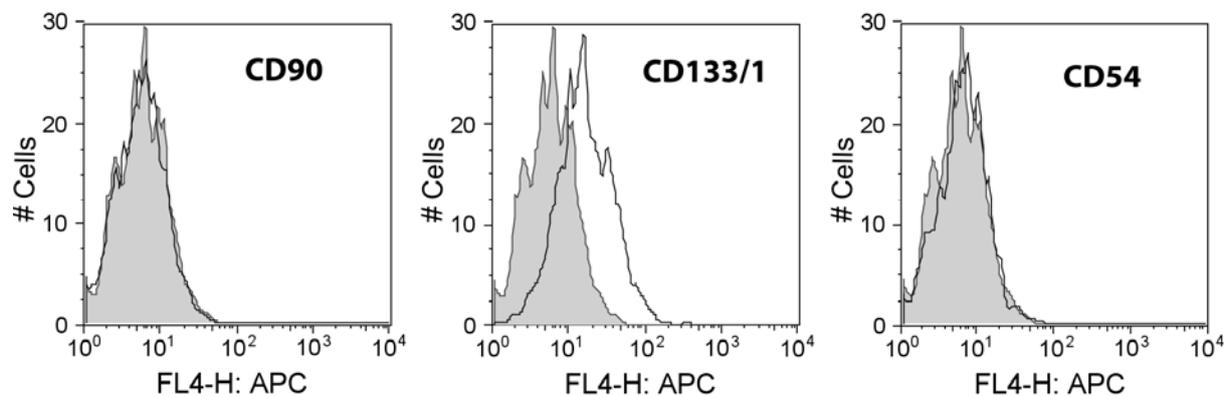


Abb. 5-8: **Oberflächenmarker der Zellfraktion EpCAM+/CD45– am Beispiel der explantierten Leber ExpIPSC\_7**

Die Zellen waren CD133/1-positiv sowie CD90- und CD54-negativ. Die grau hinterlegte Kurve zeigt die durch den Isotyp gefärbten Zellen und dient als Negativkontrolle. CD: Cluster of Differentiation

### 5.4.4 Die Zellfraktion EpCAM–/CD45–

Der relative Anteil der Zellfraktion EpCAM–/CD45– betrug in der NPC der Explantatlebergruppe  $47,8 \% \pm 10,1$  SEM (Median: 40,6 %) und in der NPC der Leberteilresektatgruppe  $47,4 \% \pm 14,8$  SEM (Median: 34,8 %). In beiden Gruppen konnten in dieser Zellfraktion CD90-positive und CD54-positive Zellen nachgewiesen werden. Zudem wurde bei einigen Lebern eine geringe Menge schwach CD133/1-positiver Zellen beobachtet.

Der Anteil CD90-positiver Zellen betrug in der Explantat-Gruppe  $14,8 \% \pm 2,3$  SEM und in der Leberteilresektat-Gruppe  $6,7 \% \pm 2,6$  SEM. Dieser Unterschied war signifikant ( $p = 0,001$ ). Dagegen konnte kein signifikanter Unterschied des Anteils CD54-positiver Zellen zwischen den Gruppen festgestellt werden (Explantat-Gruppe  $1,80 \% \pm 0,81$  SEM und Leberteilresektat-Gruppe  $0,39 \% \pm 0,07$  SEM). Der Anteil CD133/1-positiver Zellen

betrug in der Explantat-Gruppe  $0,25 \% \pm 0,14$  SEM und in der Leberteilresektat-Gruppe  $0,34 \% \pm 0,19$  SEM. Dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant.

Die Ergebnisse sind am Beispiel einer PSC-Leber (ExpIPSC\_7) in Abb. 5-9 dargestellt.

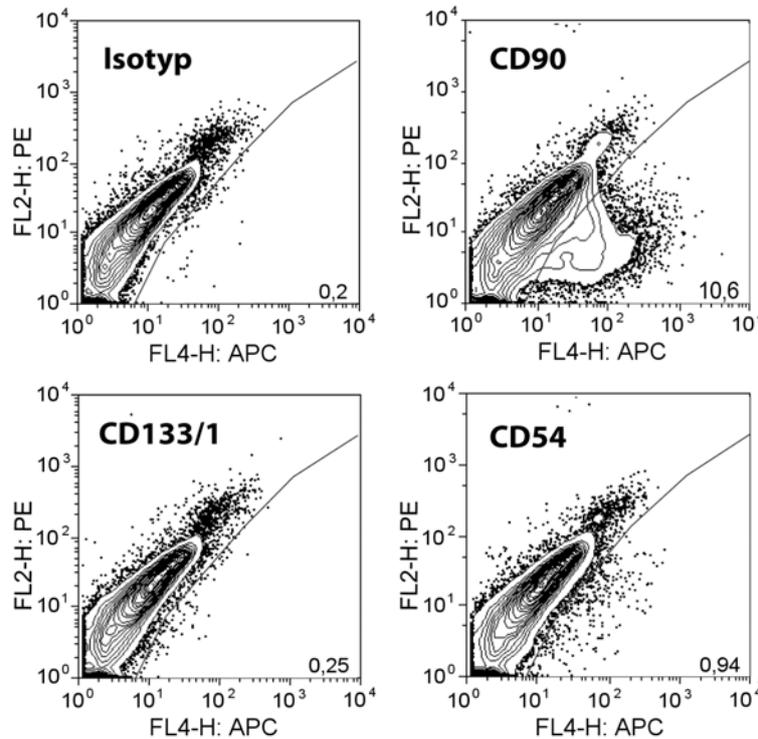


Abb. 5-9: **Oberflächenmarker der Zellfraktion EpCAM-/CD45- am Beispiel der explantierten Leber ExpIPSC\_7**

Die Zellen waren zum Teil CD90- und CD54-positiv. In diesem Beispiel konnten keine CD133/1-positiven Zellen nachgewiesen werden. Das Gate in der unteren rechten Ecke zeigt die für den jeweiligen Antikörper positiven Zellen (Anteil an der Gesamtpopulation in Prozent). CD: Cluster of Differentiation

#### 5.4.5 Die Zellfraktion EpCAM-/CD45+

Sowohl in der Explantatlebergruppe als auch in der Leberteilresektatgruppe wurden CD90-positive Zellen in der Zellfraktion EpCAM-/CD45+ beobachtet. Mit Ausnahme einer PSC-Leber (ExpIPSC\_5) konnte ebenfalls in allen Proben ein Anteil CD54-positiver Zellen nachgewiesen werden. Keine der gemessenen Proben wies CD133-positive Zellen auf. Da es sich bei der Zellfraktion EpCAM-/CD45+ sehr wahrscheinlich um Leukozyten handelte, wurden die hier genannten Anteile nicht weiter quantifiziert.

## 5.5 Ergebnisse der Anreicherung potentieller Leberzellvorläufer mit zwei verschiedenen Verfahren

### 5.5.1 Ermittlung der Anreicherungseffizienz der OptiPrep<sup>™</sup>-Dichtegradientenzentrifugation für EpCAM-positive Zellen

Die NPC der in Kap. 5.4.1 genannten Lebern, mit Ausnahme einer explantierten Leber der PSC-Gruppe, wurde mit Hilfe der OptiPrep<sup>™</sup>-Dichtegradientenzentrifugation angereichert. Vor und nach der Anreicherung wurde der Anteil EpCAM-positiver und CD45-positiver Zellen ermittelt.

Der mittlere Gehalt an EpCAM-positiven Zellen in der NPC „nach OptiPrep“ betrug in der Zirrhose-Gruppe  $2,72 \% \pm 1,87 \text{ SEM}$  (Median: 1,21 %) und in der PSC-Gruppe  $2,74 \% \pm 1,01 \text{ SEM}$  (Median: 2,06). Der Unterschied zu den Werten vor der Anreicherung war weder für die Gruppe der Zirrhose-Lebern noch für die PSC-Lebern signifikant. Analog zu den Ergebnissen der NPC „vor Anreicherung“ waren auch hier tendenziell mehr EpCAM-positive Zellen in den NPC explantierter Lebern im Vergleich zu den Leberteilresektaten zu finden (Abb. 5-10).

Die NPC aus Leberteilresektaten enthielt nach der Anreicherung im Mittel  $0,09 \% \pm 0,05 \text{ SEM}$  (Median: 0,08 %) EpCAM-positive Zellen. Somit konnte keine Anreicherung der ohnehin sehr geringen Anteile EpCAM-positiver Zellen festgestellt werden.

Die Anwendung der OptiPrep<sup>™</sup>-Dichtegradientenzentrifugation führte jeweils zu einem Verlust der absoluten Zellzahl EpCAM-positiver Zellen. Dieser Verlust betrug bei explantierten Lebern zwischen 5,4 und 89,7 %. Die wenigen EpCAM-positiven Zellen der NPC aus Leberteilresektaten gingen zum Teil vollständig (99,4 %) verloren.

Durch die Anreicherung mittels OptiPrep<sup>™</sup>-Dichtegradientenzentrifugation kam es zu keiner signifikanten Änderung des Gehaltes an CD45-positiven Zellen in den jeweiligen Gruppen.

### 5.5.2 Charakterisierung der Nichtparenchymalen Zellfraktion nach der OptiPrep™ - Dichtegradientenzentrifugation

Analog zu der NPC vor den Anreicherungsverfahren wurden die Zellfraktionen EpCAM+/CD45-, EpCAM-/CD45- und EpCAM-/CD45+ von vier explantierten Lebern und drei Leberteileresektaten nach der OptiPrep™ -Dichtegradientenzentrifugation weiter charakterisiert. Die Zellfraktionen wurden hier ebenfalls auf die parallele Expression der Oberflächenmarker CD90, CD133/1, CD54 und CD56 hin untersucht.

Bei allen Proben konnte im Rahmen dieser Charakterisierung kein signifikanter Unterschied zwischen der NPC „vor Anreicherung“ und der NPC „nach OptiPrep“ festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden daher hier nicht gesondert präsentiert. Sie entsprechen den in Kap. 5.4 dargestellten Ergebnissen der NPC „vor Anreicherung“.

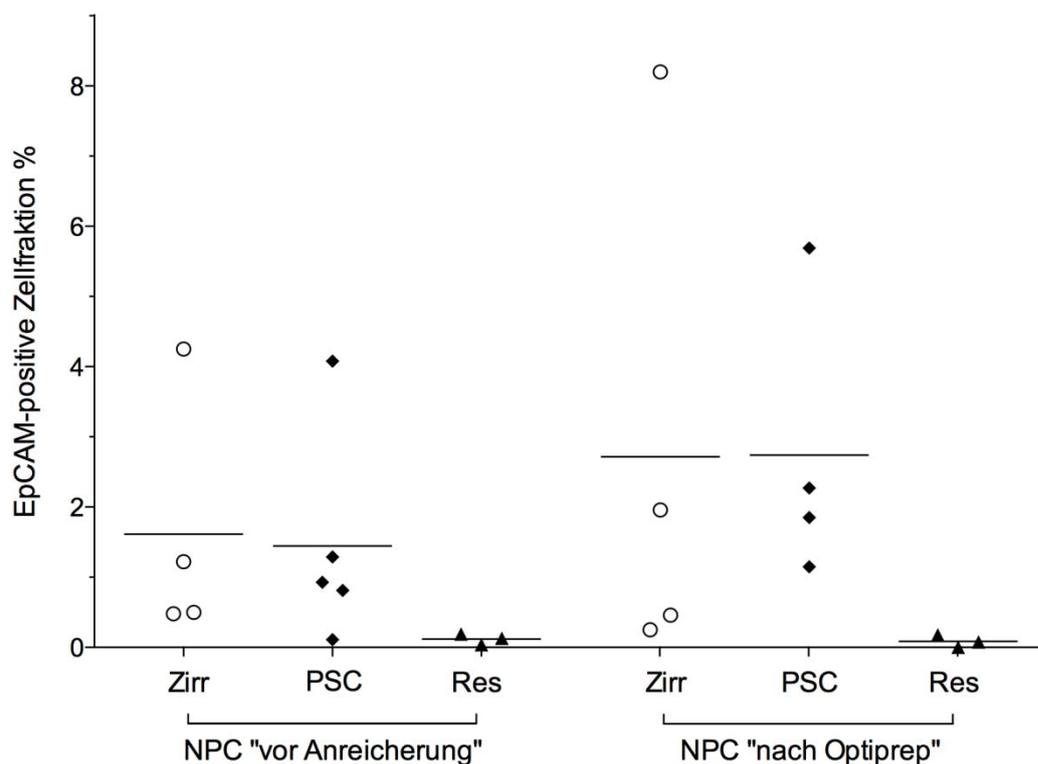


Abb. 5-10: Relativer Anteil EpCAM-positiver Zellen an der Nichtparenchymalen Zellfraktion (NPC) von explantierten Lebern und Leberteileresektaten vor und nach der Anreicherung durch OptiPrep™ - Dichtegradientenzentrifugation

Zirr: explantierte Lebern der Zirrhose-Gruppe; PSC: explantierte Lebern der PSC-Gruppe; Res: Leberteileresektate.

### 5.5.3 Anreicherung mittels Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®) für EpCAM-positive Zellen

Aus der NPC von sechs explantierten Lebern wurden mit Hilfe des MACS®-Verfahrens EpCAM-positive Zellen angereichert. Dabei handelte es sich um zwei Zirrhose-Lebern und vier PSC-Lebern.

In fünf von sechs Fällen betrug die erhaltene Gesamtzellzahl nach Anreicherung weniger als 0,6 Mio. Zellen. Lediglich bei einer PSC-Leber konnten 4 Mio. Zellen angereichert werden.

Auf Grund der sehr geringen Zellzahl war eine weitergehende Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie nur bedingt durchführbar. Auch eine Verarbeitung und Transplantation dieser geringen Menge, wie im weiteren Versuch geplant, schien nicht sinnvoll. Daher wurde das Anreicherungsverfahren mittels MACS für die folgenden Versuche nicht weiter verwendet.

## 5.6 Einfluss der Monocrotalin-Vorbehandlung immundefizienter Mäuse auf die Repopularisierung der Mausleber

### 5.6.1 Durchgeführte Zelltransplantationen

Es wurde bei immundefizienten Mäusen mit (MCT-Gruppe) oder ohne (SHAM-Gruppe) vorheriger Monocrotalin (MCT)-Injektion je eine Leberteileresektion und eine Zelltransplantation bestehend aus humanen Hepatozyten und LcProg durchgeführt (Gruppeneinteilung siehe Tab. 4-3). Die MCT-Injektion wurde 15 – 24 Stunden vor dem operativen Eingriff durchgeführt. Die Zellen für die Zelltransplantation stammten aus den Leberteileresektaten LTRes\_5 bis LTRes\_9 (Tab. 5-2). Die Tiere wurden nach 15 Tagen finalisiert und bezüglich einer Repopularisierung mit humanen Leberzellen analysiert.

In der MCT-Gruppe konnten sieben Mäuse erfolgreich transplantiert werden. Vier Tiere verstarben in der Aufwachphase, zwei Tiere mussten gemäß dem *score sheet* vor Erreichen der 15 Tage finalisiert werden und zwei weitere Tiere wurden auf Grund eines Behandlungsfehlers vom Versuch ausgeschlossen. Alle fünf Kontrolltiere (ohne Zelltransplantation) der MCT-Gruppe überlebten den Eingriff über 15 Tage.

In der SHAM-Gruppe wurden zehn Tiere erfolgreich transplantiert. Auch an den drei Kontrolltieren dieser Gruppe konnte der Versuch ohne Verluste durchgeführt werden. Eine Übersicht der Tiere aus beiden Gruppen, bei denen der Versuch erfolgreich abgeschlossen wurde, ist in Tab. 5-3 dargestellt.

Die tatsächlich applizierte Zellzahl in der MCT-Gruppe wich von der im Vorfeld geplanten Zellzahl von 1,25 Mio. je Tier (1 Mio. Hepatozyten und 0,25 Mio. LcProg) ab. So wurden bei den ersten fünf Tieren der MCT-Gruppe im Mittel 0,65 Mio. Zellen  $\pm$  0,04 SEM je Tier appliziert und bei allen weiteren Tieren der MCT-Gruppe durchschnittlich 1,52 Mio. Zellen  $\pm$  0,10 SEM. In der SHAM-Gruppe waren diese Abweichungen mit 1,41 Mio. Zellen  $\pm$  0,09 SEM für alle behandelten Tiere geringer. Es wurde kein signifikanter Unterschied der applizierten Zellzahl zwischen der MCT- und der SHAM-Gruppe festgestellt.

Die durchschnittliche Viabilität der applizierten Zellen betrug in der MCT-Gruppe 59,2 %  $\pm$  2,9 SEM und in der SHAM-Gruppe 44,9 %  $\pm$  1,8 SEM. Somit wurden in der MCT-Gruppe Zellen mit einer signifikant höheren Viabilität ( $p = 0,0008$ ) transplantiert (Abb. 5-13).

<b>MCT-Gruppe: MIT Monocrotalin-Vorbehandlung der Tiere</b>						
Bez. Resektat	Bez. Tier	ZZ inj. (Mio.)	Viab. (%)	ELISA hAlb	Histol. hAlb	PCR (hAlb/Alu)
I.R.1 (LTRes_5)	I.R.1_1	0,68	71,4	neg	<b>pos</b>	<b>pos/pos</b>
	I.R.1_2	0,70	64,0	neg	<b>pos</b>	<b>pos/pos</b>
	I.R.1_3	0,77	57,6	neg	<b>pos</b>	<b>pos/pos</b>
	I.R.1_4	0,55	64,0	neg	<b>pos</b>	neg/ <b>pos</b>
I.R.2 (LTRes_6)	I.R.2_3	1,65	49,6	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	I.R.2_5	1,72	54,1	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
I.R.3 (LTRes_7)	I.R.3_1	1,61	53,3	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
I.Kontr.	I.K.4_1-5 (5 Tiere)	/	/	neg	neg	neg/ neg
<b>SHAM-Gruppe: OHNE Monocrotalin-Vorbehandlung der Tiere</b>						
Bez. Resektat	Bez. Tier	ZZ inj. (Mio.)	Viab. (%)	ELISA hAlb	Histol. hAlb	PCR (hAlb/Alu)
II.R.1 (LTRes_8)	II.R.1_1	1,28	47,4	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	II.R.1_2	1,75	43,4	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	II.R.1_3	1,64	42,9	neg	neg	neg/ neg
	II.R.1_4	1,70	38,7	neg	neg	neg/ neg
	II.R.1_5	1,68	33,5	neg	neg	neg/ neg
II.R.2 (LTRes_9)	II.R.2_1	1,29	44,4	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	II.R.2_2	1,39	49,6	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	II.R.2_3	0,94	54,6	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	II.R.2_4	1,12	46,4	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
	II.R.2_5	1,32	47,6	neg	<b>pos</b>	neg/ neg
II.Kontr.	II.K.3_1-3 (3 Tiere)	/	/	neg	neg	neg/ neg

Tab. 5-3: Übersicht der Tiere im Versuch mit 15 Tagen Überlebenszeit

Bez.: Bezeichnung; ZZ inj: injizierte Zellzahl in Mio.; Viab.: Viabilität der Zellen bei Injektion in %; hAlb: humanes Albumin; hAlb/Alu: RNA humanes Albumin/ DNA AluSequenzen; Kontr.: Kontrolltiere ohne Zelltransplantation

### 5.6.2 Analyse des Mausserums auf humanes Serumalbumin

Es wurde das Serum der Mäuse auf humanes Serumalbumin mittels *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untersucht. In keinem der transplantierten Tiere konnte auf diese Weise humanes Serumalbumin nachgewiesen werden.

### 5.6.3 Nachweis der Repopularisierung: immunhistochemische Färbung

Aus dem medianen Leberlappen der behandelten Mäuse wurden histologische Präparate angefertigt und mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung auf Hepatozyten untersucht, die humanes Albumin (hAlb) enthielten (Abb. 5-11).

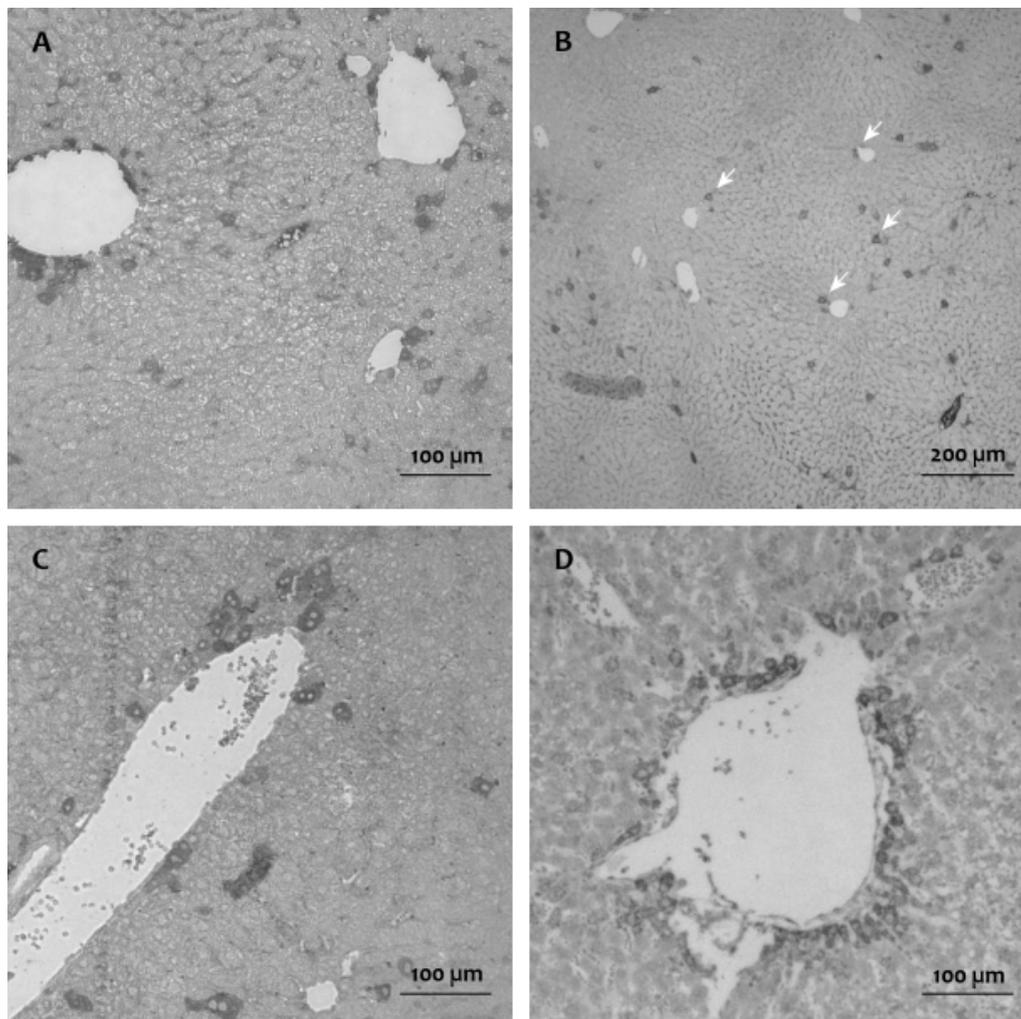


Abb. 5-11: **Repopularisierung der Mausleber durch humane Hepatozyten**

Immunhistochemische Färbung für humanes Albumin (Zellen mit dunkel gefärbtem Zytoplasma und hepatozytärem Phänotyp); A/B: Tier aus Gruppe I (I.R.1\_4); C/D: Tiere aus Gruppe II (II.R.2\_2 und II.R.2\_5)

In der MCT-Gruppe konnten in der Leber von allen sieben Tieren hAlb-positive Zellen nachgewiesen werden. In der SHAM-Gruppe war dies bei sieben von zehn Tieren der Fall (Tab. 5-2). Bei einer Korrelation der MCT- und SHAM-Gruppe mit einem „positiven“ bzw. „negativen“ Repopularisierungsergebnis war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant. Die Kontrolltiere beider Gruppen enthielten erwartungsgemäß in keinem der untersuchten Organe hAlb-positive Zellen.

#### 5.6.4 Nachweis der Repopularisierung: molekulargenetische Untersuchungen

Aus dem Lebergewebe der transplantierten Tiere sowie der Kontrolltiere wurde die RNS isoliert und auf das Vorkommen der Sequenz für humanes und für murines Albumin untersucht. Parallel dazu wurde an den gleichen Proben eine DNS-Isolierung durchgeführt und nach humanspezifischen Sequenzen (Alu-Sequenzen, AluS) gesucht.

Aus der MCT-Gruppe konnten in drei von sieben Tieren hAlb und in vier von sieben Tieren AluS nachgewiesen werden. Die Signale waren oft nur schwach ausgeprägt (Abb. 5-12). Alle positiven Tiere stammten aus derselben Untergruppe, die transplantierten Zellen also aus demselben Leberteilresektat. Die Ergebnisse für hAlb und AluS stimmten mit Ausnahme von I.R.1\_4 in jedem der Tiere überein. In der SHAM-Gruppe (ohne MCT-Injektion) waren alle zehn Tiere negativ für hAlb und AluS.

Die Kontrolltiere beider Gruppen dienten als Negativkontrollen und wiesen ebenfalls kein hAlb und keine AluS auf. Alle gemessenen Tiere waren positiv für murines Albumin.

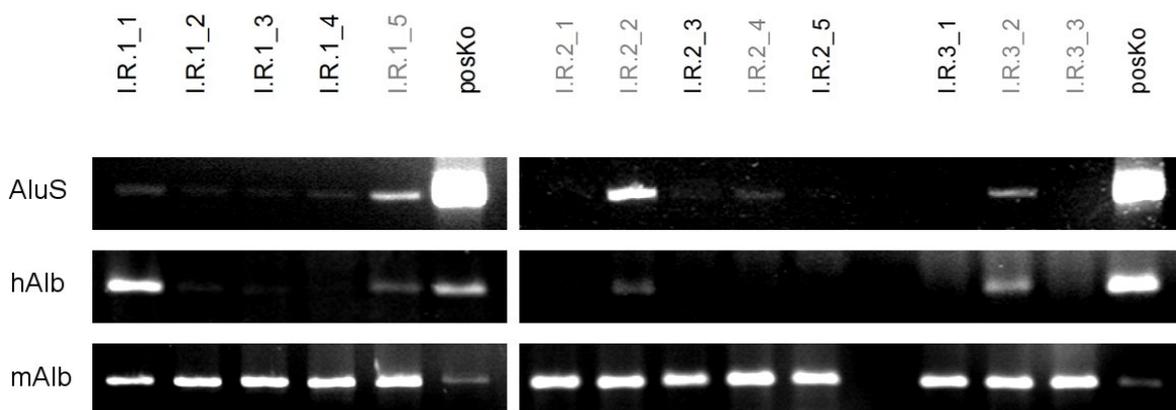


Abb. 5-12: **PCR-Ergebnisse der repopularisierten Mausleber der MCT-Gruppe**

Humanspezifische Alu-Sequenzen (AluS) und humanes Albumin (hAlb) wurden in der Mausleber der MCT-Gruppe nachgewiesen. Die grau beschrifteten Tiere verstarben vor Ende des Versuches. Die Lebern der SHAM-Gruppe sowie der Kontrollgruppen waren negativ für AluS und hAlb (nicht dargestellt). Murines Albumin (mAlb) diente als Kontrolle. posKo: Positivkontrolle aus humanem Leberteilresektat bzw. muriner Leber

### 5.6.5 Voraussetzungen für eine erfolgreiche Repopularisierung

Es wurden alle positiv auf humanes Gewebe getesteten Tiere mit den jeweils negativen Tieren bezüglich Viabilität und Zellzahl der applizierten Zellen verglichen. Die Vorbehandlung der Tiere mit MCT wurde bei dieser Betrachtung nicht berücksichtigt.

Die bei der immunhistochemischen Färbung positiv getesteten Tiere hatten bei der HcTx Zellen mit signifikant höherer Viabilität bekommen (Abb. 5-13). Die applizierte Zellzahl unterschied sich nicht signifikant.

Auch die Tiere, die mittels der molekulargenetischen Untersuchungen positiv getestet wurden, hatten Zellen mit einer signifikant höheren Viabilität erhalten. Zudem wurde diesen Tieren eine signifikant geringere Zellzahl appliziert.

Zu beachten ist, dass die Anzahl transplanteder Zellen negativ mit ihrer Zellviabilität korrelierte.

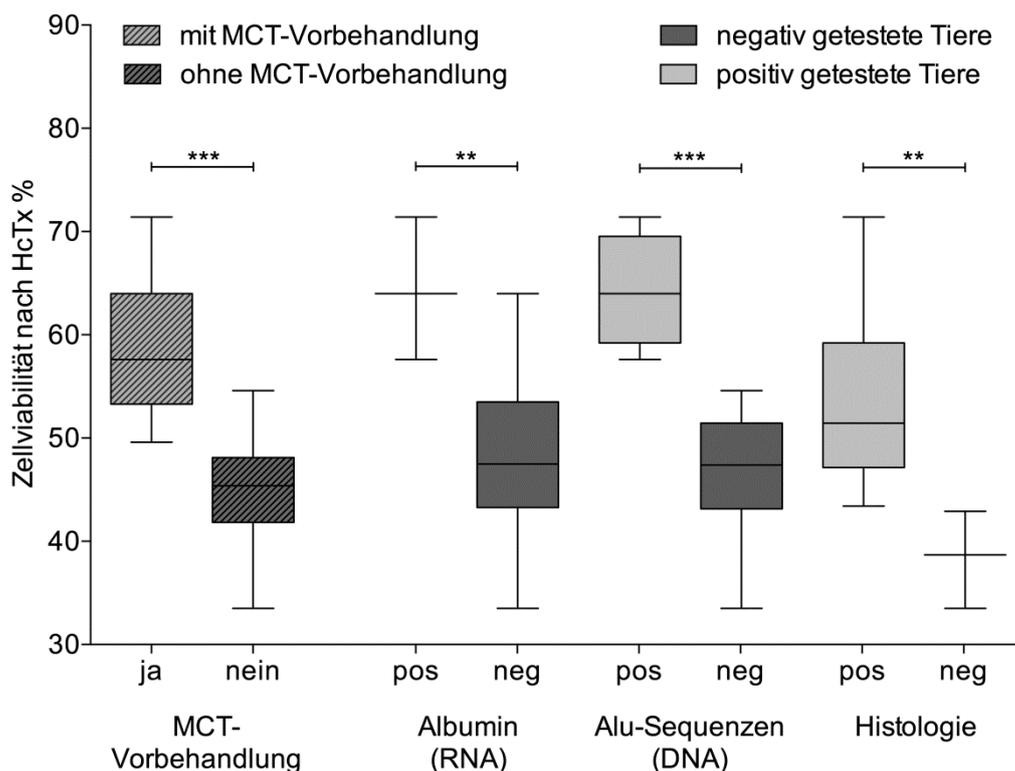


Abb. 5-13: **Vergleich der Zellviabilität transplanteder Hepatozyten im erfolgreich und nicht erfolgreich repopularisierten Mausmodell**

Die erfolgreich repopularisierten Mäuse (positiv auf humanes Albumin (Histologie bzw. RNA) oder Alu-Sequenzen getestete Tiere) hatten zuvor Zellen mit signifikant höherer Viabilität erhalten. Dies traf ebenfalls auf die Tiere mit Monocrotalin (MCT)-Vorbehandlung zu. Box-Whisker-Plot nach Tukey; HcTx: Hepatozyten-transplantation

## 6 Diskussion

### 6.1 Hepatozyten aus explantierten Lebern – Isolierung, Zellkultur und Lagerung

#### 6.1.1 Beurteilung der Zellisolierung und Zellkultur

Trotz hohem *MELD Score* und makroskopisch hochgradig verändertem Leberparenchym konnten aus explantierten Lebern funktionale Hepatozyten isoliert und kultiviert werden. Die Erfolgsquote der Isolierungen ist mit 60 % nur mittelmäßig, war jedoch nicht abhängig von der Grunderkrankung oder vom jeweiligen MELD-Wert oder Alter des Patienten. In Bezug auf die Grunderkrankung konnten hier lediglich Proben aus explantierter Leber mit PSC und Leberzirrhose verglichen werden, da die n-Zahl von Proben mit Akutem Leberversagen und Budd Chiari Syndrom nicht ausreichend war. Die Anzahl isolierter Hepatozyten je 10 g Lebergewebe variierte erheblich, konnte aber ebenfalls nicht in Zusammenhang mit den genannten Faktoren gebracht werden. Unter Kulturbedingungen verhielten sich die Hepatozyten aus explantierten Lebern bezüglich ihrer Viabilität und metabolischen Aktivität ähnlich denen aus unverändertem Lebergewebe.

In der Literatur finden sich drei Publikationen, die ebenfalls Hepatozytenisolierungen aus explantierten Lebern beschreiben. Bhogal et al. haben unter anderem je 24 explantierte Organe mit Alkoholinduzierter Leberzirrhose und biliären Erkrankungen (PSC und PBC) verwendet (Bhogal, Hodson et al. 2011). Die durchschnittliche Viabilität der daraus isolierten Hepatozyten betrug 40 % und 55 % und war somit deutlich geringer als die mittlere Viabilität der in der hier vorgestellten Arbeit isolierten Hepatozyten, einschließlich der als nicht erfolgreich eingestuften Zellisolierungen. Sie betrug für Lebern mit Alkoholischer oder Kryptogener Zirrhose  $74,5 \% \pm 3,9 \text{ SEM}$  und für PSC-Lebern  $74,5 \% \pm 4,2 \text{ SEM}$ . Eine mögliche Erklärung hierfür sind die in der Studie von Bhogal et al. teils sehr ausgedehnten Kälteischämiezeiten von bis zu 13 Stunden vor der eigentlichen Zellisolierung (Hughes, Mitry et al. 2006; Bhogal, Hodson et al. 2011). In einer anderen Studie wurden Hepatozyten aus fünf explantierten Lebern (primärer Lebertumor, polyzystische Lebererkrankung und PSC) isoliert. Alle Isolierungen waren erfolgreich bei einer mittleren Viabilität von  $76 \% \pm 8,6$ . Es wurden gezielt Lebern mit einem niedrigen labMELD-Wert von  $10,1 \pm 1,3$  ausgewählt (Kleine, Riemer et al. 2014). Der mittlere *MELD Score* der isolierten Lebern aus der hier vorgestellten Arbeit betrug  $25 \pm 11 \text{ SD}$  (7 – 40). Er hatte aber keinen nachweisbaren Einfluss auf die Isolierungsergebnisse. In einer dritten, umfangreichen Multicenter-Studie wurden Hepatozyten aus 35 Lebern mit angeborenen Leberdefekten isoliert. Die mittlere Viabilität betrug  $82 \% \pm 3$ , wobei sie in nur drei Fällen unter 60 % lag. Das Alter der Patienten war jedoch mit durchschnittlich  $10 \pm 2$  Jahren (6 Monate – 28 Jahre) deutlich geringer als das mittlere Alter der Patienten in der hier vorgestellten Arbeit. Ein geringeres Alter der Spender hat bekanntermaßen einen positi-

ven Effekt auf die Isolierungsergebnisse (Kawahara, Toso et al. 2010; Gramignoli, Tahan et al. 2013). Zudem handelte es sich ausschließlich um Erkrankungen, bei denen die Hepatozyten bis auf einen angeborenen, metabolischen Defekt keine weitere Vorschädigung erlitten hatten.

In allen drei Studien konnten die erfolgreich isolierten Hepatozyten ausgesät und über fünf bis sieben Tage in Kultur gehalten werden. Die während der Kultur durchgeführten Untersuchungen zur Ermittlung der Zellviabilität und Zellfunktion ergaben in der Regel keinen Unterschied zwischen den Hepatozyten aus explantierten Lebern und den Zellen aus unverändertem Lebergewebe. Als Vergleichskulturen dienten hierbei Hepatozyten aus Leberteilresektaten oder aus für die Lebertransplantation abgelehnten Organen. In einigen Fällen schnitten die Hepatozyten aus explantierten Lebern sogar besser ab. Lediglich in der Studie von Bhogal et al. zeigten die Hepatozyten aus Lebern mit Alkohol-induzierter Zirrhose eine signifikante geringere Produktion von humanem Albumin als die anderen Zellkulturen (Bhogal, Hodson et al. 2011).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden, mit einer Ausnahme, keine signifikanten Unterschiede in der Zellkultur zwischen explantierten Lebern und Leberteilresektaten gemessen. Lediglich an Tag 1 und für das Enzym ALT wies der Mediumüberstand der Zirrhose-Lebern eine signifikant höhere Enzymkonzentration im Vergleich zu den Leberteilresektaten auf. Analog zu der Arbeit von Bhogal et al. konnte eine verminderte Produktion von humanem Albumin durch die Zellkulturen aus explantierten Lebern hier zumindest als Tendenz beobachtet werden. Dies traf ebenso für das Stoffwechselprodukt Harnstoff zu. Beide Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant.

Interessanterweise gab es Anhaltspunkte, dass Zellkulturen aus explantierten Lebern in der Langzeitkultur stabiler sind. An Tag 7 konnte bei den Zellkulturen aus Leberteilresektaten ein hochsignifikanter Rückgang ( $p = 0,001$ ) des Resorufin-Umsatzes beobachtet werden, was auf eine verminderte metabolische Aktivität schließen lässt. Zudem wurde bei zwei von fünf Zellkulturen aus Leberteilresektaten ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivitäten an Tag 7 im Vergleich zu Tag 5 beobachtet. Dies war bei keiner der Zellkulturen aus explantierter Leber der Fall. Eine Ursache hierfür liegt möglicherweise darin, dass die Hepatozyten aus den hochgradig erkrankten Lebern bereits besser an suboptimale Sauerstoff- und Nährstoffversorgung angepasst sind und somit außerhalb des Körpers länger ihre normale Funktion aufrecht erhalten können.

### 6.1.2 Beurteilung der Lagerung von Hepatozyten aus explantierten Lebern

Bei der Kühlung in den Medien ChillProtec® (CP) oder ChillProtec® plus (CP+) zeigten die Hepatozyten aus erkrankten, explantierten Lebern keine höheren Verluste der Viabilität und Zellzahl als Hepatozyten aus unverändertem Lebergewebe.

Generell konnte der höchste Viabilitätsverlust bei allen Proben in den ersten 24 Stunden registriert werden. Dies deckt sich mit den Resultaten einer anderen Arbeitsgruppe, die Hepatozyten über 24 h, 48 h und 72 h in University of Wisconsin-Lösung (UW-Lösung) bei 4 °C gelagert hat (Gramignoli, Dorko et al. 2014). Lediglich bei der Kombination von Hepatozyten aus explantierter Leber und CP+ kam es nicht zu einem signifikanten Verlust der Viabilität. Der hier angewandte Viabilitätstest TBE beruht auf einer erhöhten Durchlässigkeit der Zellmembran toter Zellen. Zellen, die bereits erste apoptotische Stoffwechselwege eingeleitet haben, weisen nicht sofort eine durchlässige Zellmembran auf. So wurden wahrscheinlich direkt nach der Zellsolierung nicht alle toten bzw. apoptotischen Hepatozyten erkannt, die dann während der ersten Lagerung über 24 Stunden die entsprechenden Zellmembranschäden entwickelten.

In einigen Fällen wiesen die Hepatozyten nach 48 Stunden eine höhere Viabilität auf als nach 24 Stunden. Möglicherweise kam es am zweiten Tag während der Kühlung verstärkt zum Zerfall bereits toter Zellen. Die aufgelösten Zellen wurden beim TBE nicht mehr mitgezählt und auf Grund der geringeren Gesamtzellzahl ergab sich ein günstigeres Verhältnis für die viablen Zellen.

Im Vergleich zu der von Gramignoli et al. genutzten UW-Lösung schnitt das Medium CP+ deutlich besser ab. Während die Hepatozyten bei einem ähnlichen Versuchsaufbau in UW-Lösung einen Viabilitätsverlust von ca. 29 % (Gramignoli, Dorko et al. 2014) oder 25 % (Jorns, Gramignoli et al. 2014) über 48 Stunden erlitten, waren es bei CP+ nur 18,1 % ± 6,1 SEM für Hepatozyten aus Leberteilresektaten bzw. 14,4 % ± 4,6 SEM für Hepatozyten aus explantierten Lebern.

Leberzellen reagieren vergleichsweise empfindlich auf Kühlung und die Effekte des Wiederaufwärmens (Pless, Sauer et al. 2012; Fuller, Petrenko et al. 2013). Zu den wichtigsten Mechanismen hierbei zählen die Störung des Ionenhaushaltes bei Hypothermie, Änderung des intra- und extrazellulären PH-Wertes sowie osmotisch bedingtes Anschwellen und oxidativer Stress der Hepatozyten. Zudem führt die relative Größe der Zellen zu einer schnellen Sedimentation und Bildung dichter Zellagglomerate, was schnell zu hypoxischen Bedingungen führt. Um diesen schädigenden Mechanismen aus dem Weg zu gehen, werden angepasste Ionenkonzentrationen, Puffersysteme, osmotisch aktive Substanzen und Antioxidantien in den Kühlungsmedien eingesetzt (Fuller, Petrenko et al. 2013). Da die Medien CP und CP+ speziell für die Kühlung von Zellen in Suspension entwickelt wurden (Rezeptur der Medien ist geschützt), kann

davon ausgegangen werden, dass die Schutzmechanismen in diesen Medien entsprechend optimiert wurden. Dies ist bei UW-Lösung, welche ursprünglich für die Lagerung ganzer Organe entwickelt wurde, nicht der Fall.

Alle in CP und CP+ gelagerten Hepatozyten aus explantierten Lebern ließen sich nach 24 und 48 Stunden erfolgreich aussäen und unterschieden sich in den darauffolgenden fünf Kulturtagen morphologisch nicht von den frisch ausgesäten Zellen. Eine statistisch auswertbare Entnahme und Messung der Mediumüberstände wurde nur für eine von vier explantierten Lebern durchgeführt. Dort wurden in den ersten drei Kulturtagen signifikant höhere Enzymaktivitäten bei den zuvor kühl gelagerten Hepatozyten gemessen. Dies lässt sich sehr wahrscheinlich auf die oben genannte Belastung der Hepatozyten während der Lagerung zurückführen.

Trotz nicht unerheblicher Verluste wurden auch nach 48stündiger Kühlung bei Hepatozyten aus explantierter Leber oder aus Leberteileresektaten Viabilitäten von über 60 % erreicht. Eine Kultur der Zellen war prinzipiell möglich, auch wenn der Nachweis ihrer Funktionalität nicht endgültig gelungen ist. Somit wurde die Kühlung von Hepatozyten über bis zu 48 h zum Zwecke der verzögerten Zelltransplantation als erfolgreich beurteilt. Dies war eine Voraussetzung für die Anwendung im darauffolgenden Tiermodell.

Wurden die Kühlungsmethoden CP und CP+ bezüglich des Viabilitäts- und relativen Zellverlustes der Hepatozyten direkt verglichen, konnte lediglich nach 48 h Kühlung von Hepatozyten aus Leberteileresektaten ein signifikanter Unterschied ( $p = 0,049$ ) festgestellt werden. Die in CP+ gelagerten Zellen wiesen dabei eine höhere Viabilität auf. Beide Kühlungsmethoden waren jeweils signifikant besser als das Vergleichsmedium mod. Will E. Für die Versuche im Tiermodell wurde das Medium CP+ ausgewählt.

### 6.1.3 Eignung von aus explantierten Lebern isolierter Hepatozyten für die Zelltransplantation

Trotz der vergleichsweise schlechten Ausgangsbedingungen der Hepatozyten aus Explantatleber (hoher *MELD Score*, hochgradig verändertes Leberparenchym) konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied der Isolierungsergebnisse zwischen explantierten Lebern und Leberteileresektaten festgestellt werden. Auch in der Zellkultur waren die messbaren Unterschiede gering. Im *Cold Storage* Versuch konnten die Hepatozyten aus erkrankten Lebern über mindestens 48 Stunden mit akzeptablen Verlusten der Viabilität gelagert werden.

In einer Konsensuskonferenz zum Thema der humanen Hepatozytentransplantation wurde über Kriterien beraten, mit denen Hepatozyten nach der Isolierung auf ihre Eig-

nung zur Zelltransplantation bewertet werden können (Puppi, Strom et al. 2012). Hierbei stellte sich heraus, dass der TBE zwar am häufigsten verwendet wird, jedoch keine gesicherten Daten über seinen tatsächlichen Nutzen zur Verfügung stehen. Als *in vitro*-Testverfahren mit der höchsten Aussagekraft wurde der Ausplattierungserfolg (engl. *plating efficiency*) eingestuft. Er beschreibt die Fähigkeit von Hepatozyten, sich *in vitro* an eine geeignete Oberfläche zu heften und dort für mehrere Tage in Kultur zu überleben. In dieser Arbeit wurde der Ausplattierungserfolg nicht gesondert bestimmt. Er kann jedoch als hoch eingeschätzt werden, da alle erfolgreich isolierten Hepatozyten in Kultur über sieben Tage eine geschlossene Monolayerschicht bildeten (Abb. 5-2).

Auch in den durchgeführten Zellkulturen unterschieden sich die Hepatozyten von erkranktem und unverändertem Lebergewebe nicht signifikant. Dies unterstützt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass aus chronisch erkrankten Lebern Hepatozyten mit vergleichbarer Viabilität und Funktion wie bei der Isolierung aus unverändertem Lebergewebe gewonnen werden können. Eine Verwendung dieser Hepatozyten zur Zelltransplantation erscheint somit grundsätzlich möglich.

Als Goldstandard der Beurteilung von Zellen für die Hepatozytentransplantation wird jedoch ihre Repopulationsfähigkeit im Tiermodell angesehen (Puppi, Strom et al. 2012). Dies wurde durch Gramignoli et al. am Beispiel von fünf Lebern bereits erfolgreich durchgeführt. Es handelte sich jedoch ausschließlich um Hepatozyten aus sehr jungen Patienten, die an einem angeborenen Leberdefekt litten (Gramignoli, Tahan et al. 2013). In Vorbereitung einer entsprechenden Studie für die in dieser Arbeit vorgestellte Population explantierter Lebern wurde ein neuartiges Tiermodell entwickelt.

Die hier vorgestellten erfolgsversprechenden Ergebnisse sollten durch weitere Versuche bestätigt und erweitert werden. Dabei wären die im Folgenden genannten Dinge zu beachten.

Es sollte eine höhere Erfolgsquote bei der Hepatozytenisolierung angestrebt werden. Da hierbei der *MELD Score* und das Alter der Patienten keinen Einfluss hatten, scheinen labortechnische Faktoren eine größere Bedeutung für den Isolierungserfolg zu haben. Einen möglichen Ansatzpunkt bietet die Verwendung eines weniger aggressiven Enzyms bei der Verdauung. Die Verdauzeit ist auf Grund der oft hochgradigen Fibrosierung des Gewebes deutlich länger als bei unverändertem Lebergewebe, so dass die Hepatozyten dem Enzym länger ausgesetzt sind. Eine Zugabe von N-Acetylcystein in die Enzymlösung kann die Ergebnisse der Hepatozytenisolierung zusätzlich positiv beeinflussen (Sagias, Mitry et al. 2010; Bartlett, Hodson et al. 2014).

Ein weiterer Punkt, der jedoch für jegliches Lebergewebe zutrifft, ist die Verkürzung der Wärmeschämiezeit vor der Zellisolierung (Hughes, Mitry et al. 2006; Kawahara, Toso et al. 2010). Möglicherweise könnten die explantierten Lebern vor der Leberzellisolierung

ähnlich behandelt werden wie die Spenderorgane vor der Implantation. Neben der statischen Perfusion mit entsprechenden Kühlagerungsmedien (z. B. UW-Lösung) bestünde theoretisch die Möglichkeit einer maschinellen, extrakorporalen Organperfusion, die unter hypo- oder normothermen Bedingungen durchgeführt werden kann. Solche Techniken sind jedoch selbst für zu implantierende Spenderlebern noch in der Entwicklung (Nebrig, Neuhaus et al. 2014).

Die Kühlagerung der Hepatozyten nach der Zellisolierung ermöglicht eine über mehrere Tage gesplittete HcTx, wodurch die Gesamtanzahl transplanteder Zellen gesteigert werden kann. Auf Grund der Gefahr einer portalen Thrombosierung sollten bei jeder HcTx-Sitzung nicht mehr als 5 % der Gesamtlebermasse infundiert werden (Fox, Chowdhury et al. 1998; Hughes, Mitry et al. 2012). Obwohl in dieser Arbeit die Kühlagerung der isolierten Hepatozyten über mindestens 48 Stunden als erfolgreich beurteilt wurde, waren jeweils nicht unerhebliche Viabilitätsverluste zu verzeichnen. Eine alternative Methode der Zelllagerung testeten Jorns et al., indem sie das intakte Lebergewebe für 48 Stunden in UW-Lösung lagerten und erst anschließend die Zellisolierung durchführten. Die so gelagerten Hepatozyten wiesen eine höhere Viabilität und einen höheren Ausplattierungserfolg auf als solche, die erst isoliert und dann in UW-Lösung gelagert wurden (Jorns, Gramignoli et al. 2014). Begründet wurde dies mit der Tatsache, dass Hepatozyten in Suspension ohne Kontakt zueinander bereits kurze Zeit nach der Isolierung apoptotische Schritte einleiten (Smets, Chen et al. 2002). Diese Art der Lagerung im Gewebeverband ließe sich mit der oben vorgeschlagenen Präkonditionierung explantierter Lebern vor der Zellisolierung kombinieren. Es müsste jedoch zuvor getestet werden, ob der erwartete Vorteil unter Anwendung des Kühlagerungsmediums CP+ bestehen bleibt.

Letztendlich sollten die hier vorgestellten positiven Ergebnisse der Hepatozytenisolierung aus chronisch erkrankten Lebern anhand von Tiermodellen bestätigt werden. Wichtige Punkte dabei sind vor allem der Nachweis der Repopularisierungsfähigkeit, die Funktionalität der Zellen *in vivo* und die fehlende Abstoßung autologer Zellen nach der Retransplantation.

## 6.2 Bewertung der Isolierung von Leberzellvorläufern aus explantierten Lebern

Aus hochgradig verändertem Gewebe explantierter Lebern konnten potentielle LcProg isoliert werden. Ihr Anteil war höher als in unverändertem Lebergewebe. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Der Oberflächenmarker EpCAM gilt als gemeinsamer Marker für alle Vorläuferstufen von Hepatozyten und Cholangiozyten (de Boer, van Krieken et al. 1999; Schmelzer, Zhang et al. 2007; Aupet, Simone et al. 2013). Er wird daher in dieser Arbeit zur Identifizierung von LcProg in den untersuchten Geweben verwendet. Die hier nachgewiesenen EpCAM-positiven Zellen waren zugleich positiv für CD133/1. Dies unterstützt die Theorie, dass es sich dabei um Vorläuferzellen handelte (Craig, Quaglia et al. 2004; Schmelzer, Wauthier et al. 2006; Tsuchiya, Kamimura et al. 2009). Die Zellen waren zudem negativ für die Marker CD90 und CD54. Sie entsprachen damit grundsätzlich dem Phänotyp der in der Publikation von Schmelzer et al. beschriebenen Hepatischen Stammzellen (Schmelzer, Zhang et al. 2007). Einschränkend muss jedoch gesagt werden, dass die in der Publikation ebenfalls genannten Marker AFP, CK19 und Albumin hier nicht bestimmt wurden.

Es konnte kein signifikant höherer Gehalt an EpCAM-positiven Zellen in der NPC von explantierten Lebern im Vergleich zu unverändertem Lebergewebe nachgewiesen werden, auch wenn tendentiell mehr EpCAM-positive Zellen bei den explantierten Lebern beobachtet wurden. Diese Tendenz war sowohl vor als auch nach der Anreicherung mittels OptiPrep<sup>™</sup>-Dichtegradientenzentrifugation vorhanden (Abb. 5-10). Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass auf Grund der starken Streuungen des Gehaltes an EpCAM-positiven Zellen in der Gruppe der explantierten Lebern hier keine signifikanten Ergebnisse erreicht wurden. Dies wäre durch eine Vergrößerung der Stichprobe zu überprüfen.

Es konnte kein Unterschied in der Anzahl und Art der LcProg zwischen den Erkrankungen Alkoholische oder Krypogene Leberzirrhose und PSC festgestellt werden. Dies ist nicht überraschend, da ein Großteil der PSC-Lebern zugleich zirrhatische Veränderungen aufwies. Die Leberzirrhose als morphologische Reaktion der Leber auf eine chronische Noxe führt unabhängig von ihrer Ursache zu ähnlichen pathophysiologischen Mechanismen. Diese wiederum rufen einen ähnlichen Phänotyp an LcProg hervor (Crawford 2002).

Der Anteil EpCAM-positiver Zellen in dieser Arbeit betrug in der NPC explantierter Lebern  $1,52 \% \pm 0,52 \text{ SEM}$  (Median:  $0,93 \%$ ) und in der NPC des unveränderten Lebergewebes  $0,12 \% \pm 0,04 \text{ SEM}$  (Median:  $0,13 \%$ ). Schmelzer et al. erhielten mit einer ähnlichen Isolierungsmethode aus unveränderten, adulten Lebern deutlich mehr EpCAM-positive Zellen ( $1,3 \% \pm 1,0$ ). Aus pädiatrischen und neonatalen Lebern konnte das zwei- bis dreifache isoliert werden und fötale Lebern enthielten sogar  $12,1 \% \pm 2,3$  EpCAM-positive Zellen (Schmelzer, Zhang et al. 2007). In einer anderen Arbeitsgruppe wurden aus

zirrhotischen und nicht zirrhotischen Lebern 0,98 (0,14 – 5,91) Mio. EpCAM-positive Zellen/ 10g Lebergewebe (Medianwert) isoliert (Aupet, Simone et al. 2013). Dies war ebenfalls mehr als die Absolutwerte in dieser Arbeit (umgerechnet 0,19 (0,01 – 0,90) Mio. für explantierte Lebern und 0,014 (0,004 – 0,015) Mio. für Leberteilresektate). Hier wurde jedoch eine grundsätzlich anders angelegte Isolierungsmethode verwendet. Die Ursachen für die deutlich geringere Ausbeute EpCAM-positiver Zellen in dieser Arbeit waren sehr wahrscheinlich methodisch bedingt. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre der Verzicht auf den zweiten, enzymatischen Verdauungsschritt der NPC nach der ersten Zentrifugation (0,1 % Desoxyribonuklease und 0,02 % Protease in PBS für 30 min bei 37 °C). In einer Studie an humanem und murinem Nervengewebe wurde gezeigt, dass die Enzymbehandlung einen Einfluss auf die Expression von Oberflächenantigenen hat (Panchision, Chen et al. 2007). Möglicherweise wurde ein Teil der Oberflächenantigene durch den zweiten, deutlich längeren Enzymverdau zerstört, so dass einige der EpCAM-positiven Zellen in der Durchflusszytometrie nicht mehr als solche erkannt wurden.

Der schädliche Einfluss der Enzymbehandlung wäre auch eine Erklärung dafür, dass auf keiner der isolierten Zellen der Oberflächenmarker CD56 nachweisbar war. Die Etablierung des CD56-Antikörpers war an Blutleukozyten ohne die Anwendung eines Enzymverdau vorgenommen worden.

Der Oberflächenmarker CD90 gilt ebenfalls als Marker für LcProg (Masson, Currie et al. 2006; Khuu, Najimi et al. 2007; Weiss, Lichtenauer et al. 2008). Diese Aussage ist jedoch nicht unumstritten, da er in einigen Studien stattdessen als Marker für Myofibroblasten identifiziert wurde (Dezso, Jelnes et al. 2007; Dudas, Mansuroglu et al. 2009).

Sowohl in der CD45-positiven als auch in der CD45-negativen Zellfraktion von explantierten Lebern und Leberteilresektaten konnten CD90-positive Zellen nachgewiesen werden. Bei der CD45- und CD90-positiven Fraktion handelte es sich wahrscheinlich um Vorläuferzellen der hämatopoetischen Zellreihe. Diese Vermutung hätte z. B. mit weiteren Oberflächenmarkern, wie CD34 oder CD117, verifiziert werden können (Leung and Verfaillie 2005).

In der CD45-negativen Fraktion wurde ein signifikant höherer Anteil CD90-positiver Zellen bei erkrankten, explantierten Lebern im Vergleich zu unverändertem Lebergewebe nachgewiesen. In dieser Zellfraktion wurden potentielle Leberzellvorläufer vermutet. Masson et al. isolierten aus fetaler Leber bis zu 3 % CD90-positive Zellen, von denen einige auch hepatozyten- oder cholangiozyten-spezifische Marker wie CK18 oder CK19 aufwiesen (Masson, Currie et al. 2006). In anderen Studien wurde die CD90-positive Zellfraktion aus humaner Leber in immundefiziente Mäuse transplantiert, wodurch es zu einer funktionalen Repopularisierung der Mausleber mit humanen Zellen kam (Khuu, Najimi et al. 2007; Weiss, Lichtenauer et al. 2008).

Im Gegensatz dazu beschreiben Dudas et al. zwar eine erhöhte Genexpression von CD90 in chronisch geschädigtem Lebergewebe, nach eigener Aussage handelte es sich bei diesen Zellen jedoch um aktivierte Myofibroblasten (Dudas, Mansuroglu et al. 2009). Unterstützt wird diese Aussage durch eine Studie, die auf LcProg der Ratte (Ovalzellen), welche mittels Laser-Mikrodissektion gewonnen wurden, kein CD90 nachweisen konnte. Stattdessen wurde CD90 auf Myofibroblasten aus zwei Leberfibrose-Modellen gefunden, ohne dass es hier zu einer Bildung von Ovalzellen gekommen war (Dezso, Jelnes et al. 2007).

Eine Beurteilung der hier nachgewiesenen CD90-positiven Zellen als LcProg kann also nicht abschließend erfolgen. Eine Verifizierung dieser These sollte durch mindestens eine weitere der in Kapitel 2.3.2 genannten Methoden zum Nachweis von LcProg erfolgen. Dies könnte beispielsweise eine *in vitro* Kultur der entsprechenden Zellen oder eine Zelltransplantation im *in vivo* Versuch sein.

Der Oberflächenmarker CD54 wird in der Leber von sinusoidalen Endothelzellen und in geringem Maße auch von Hepatozyten und Sternzellen exprimiert (van Oosten, van de Bilt et al. 1995; Neubauer, Wilfling et al. 2000). Da CD54 bislang nur in Kombination mit dem Marker EpCAM als LcProg angesprochen wurde, handelt es sich bei den hier nachgewiesenen EpCAM-negativen und CD54-positiven Zellen vermutlich nicht um Vorläuferzellen der Leber (Schmelzer, Zhang et al. 2007).

Zusammenfassend wurde durch diese Arbeit die Hypothese unterstützt, dass aus chronisch erkrankten Lebern mehr LcProg isoliert werden können als aus unverändertem Lebergewebe. Ein Unterschied in Art und Anzahl der LcProg in Abhängigkeit von der Grunderkrankung konnte nicht festgestellt werden.

In einigen Fällen waren die Ergebnisse nicht signifikant, was sehr wahrscheinlich an der geringen Anzahl von Proben lag. Leider fiel diese Doktorarbeit mit dem sogenannten „Organspendeskandal“ zusammen, der seit 2011 dafür sorgte, dass die Spendebereitschaft der Bevölkerung und somit die Anzahl an durchgeführten Transplantationen drastisch zurückging (Dunkel and Waage 2013). Dadurch konnten in dem vorgegebenen Zeitraum nicht alle geplanten Versuche durchgeführt werden. Eine weiterführende Studie zu dieser Arbeit sollte entweder multizentrisch angelegt sein oder durch Änderung der Ausschlusskriterien mehr Lebertransplantationen mit einschließen, um eine ausreichende Probenzahl zu gewährleisten.

## 6.3 Bewertung der Anreicherungsverfahren

### 6.3.1 OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation

Mit Hilfe der OptiPrep™-Dichtegradientenzentrifugation konnte die NPC aus explantierten Lebern nicht signifikant auf EpCAM-positive Zellen angereichert werden. Die Methode wurde aus der Publikation von Yovchev et al. übernommen, die auf diese Weise LcProg aus der NPC von Rattenleber anreicherten. Gleichzeitig wurden CD45-positive Zellen herausgefiltert. Eine Quantifizierung der angereicherten Zellfraktionen wurde bei Yovchev et al. nicht vorgenommen (Yovchev, Grozdanov et al. 2007).

In dieser Arbeit konnte der Gehalt EpCAM-positiver Zellen zwar um den Faktor 1,7 bis 1,9 erhöht werden, betrug im Endprodukt jedoch weiterhin nur ca. zwei bis drei Prozent. Durch die Anreicherung kam es zudem zu deutlichen Verlusten der absoluten Zellzahl EpCAM-positiver Zellen. Ein Großteil der Zellen im Endprodukt bestand weiterhin aus CD45-positiven Leukozyten. Auch im Rahmen der weiteren Charakterisierung mit den Oberflächenmarkern CD90, CD133/1 und CD54 wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellfraktionen „vor Anreicherung“ und „nach OptiPrep“ gefunden. Das Anreicherungsverfahren wird somit als nicht ausreichend bewertet.

### 6.3.2 Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS®)

Mit Hilfe des Magnetic-Activated Cell Sorting konnten in fünf von sechs Fällen nicht mehr als 0,6 Mio. Zellen aus der NPC explantierter Lebern angereichert werden. Diese Zellzahl war nicht ausreichend für die im Folgenden geplanten Versuche, so dass das Verfahren nicht weiter verwendet wurde.

Trotz eines zu erwartenden hohen Anreicherungsgrades EpCAM-positiver Zellen zwischen 40 und 80 % wie in den Arbeiten von ((Laurson, Selden et al. 2007; Weiss, Lichtenauer et al. 2008; Aupet, Simone et al. 2013) beschrieben, stellte die niedrige Gesamtzellzahl ein Hindernis für die sofortige Verwendung der Zellen in einer Transplantation dar.

Die alleinige Anreicherung basierend auf dem Oberflächenmarker EpCAM erwies sich auf Grund des geringen Anteils dieser Zellen an der NPC als schwierig. Eine mögliche Lösung bestünde in der Kultivierung und Vermehrung der EpCAM-positiven Zellen *in vitro*, bevor diese dann für die Zelltransplantation weiter verwendet werden (Schmelzer, Zhang et al. 2007; Aupet, Simone et al. 2013). Eine andere Arbeitsgruppe stellte jedoch fest, dass nur 0,1 % der EpCAM-positiven Zellen überhaupt Kolonien bildeten (Duncan, Dorrell et al. 2009). Bei diesem Vorgehen hätte die Zelltransplantation in zwei Schritten

durchgeführt werden müssen, um den Tieren zunächst die Hepatozyten und später die kultivierten LcProg zu transplantieren. Da eine Kultivierung von LcProg viele Wochen dauern kann, ließ sich dies mit dem geplanten Tiermodell nicht vereinen.

Die reine Selektion nach dem Oberflächenmarker EpCAM führt indes dazu, dass potentielle LcProg, die nicht EpCAM-positiv sind, aussortiert werden. Dies betreffe die Fraktionen der CD90-positiven Zellen in dieser Arbeit, die zugleich EpCAM- und CD45-negativ waren. Alternativ könnte, statt einer Anreicherung der NPC nach einem einzigen Stammzellmarker (in diesem Fall EpCAM), eine Depletion derjenigen Zellen vorgenommen werden, die definitiv keine LcProg sind. Mit Hilfe dieses Prinzipes der negativen Selektion könnten z. B. über das MACS<sup>®</sup>-Verfahren CD45-positive Zellen aus der NPC herausgefilitert- und die verbleibende Zellfraktion charakterisiert und im Anschluss für die Transplantation verwendet werden.

#### 6.4 Beurteilung der Ergebnisse des Tiermodells

Mit dem hier etablierten Tiermodell konnten erfolgreich humane Hepatozyten in immundefiziente Mäuse transplantiert werden. Der entsprechende Nachweis gelang im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit durch Tim Schmidt (siehe Kapitel 4.10). Immunhistologisch wurden dabei in 14 von 17 transplantierten Tieren humane Hepatozyten nachgewiesen. Mit der PCR gelang der Nachweis lediglich bei drei (hAlb) bzw. vier (AluS) von 17 Tieren. Diese Tiere hatten zusätzlich Monocrotalin (MCT) erhalten. Die erfolgreiche Repopularisierung der Mausleber war bei allen drei Nachweismethoden abhängig von der Viabilität der transplantierten Zellen.

Bisherige HcTx-Modelle in der Maus, welche MCT als Proliferationshemmer für die Maushepatozyten einsetzten, injizierten das Pyrrazolidinalkaloid wiederholt und mehrere Wochen vor der Zelltransplantation (Witek, Fisher et al. 2005; Weiss, Lichtenauer et al. 2008). Beide Arbeitsgruppen kombinierten die Applikation muriner bzw. humaner LcProg mit einer partiellen Hepatektomie (PH) und wiesen anschließend eine erfolgreiche Repopularisierung der Mausleber 16 bzw. sieben Wochen nach der Zelltransplantation nach. Eine derart genau zeitlich abgestimmte MCT-Injektion mehrere Wochen vor der HcTx war jedoch für die Transplantation humaner Hepatozyten aus explantierter Leber nicht möglich. Eine Lebertransplantation ist nicht im Voraus planbar, sondern wird kurzfristig nach Verfügbarkeit eines Spenderorgans durchgeführt.

Wu et al. führten bereits 24 Stunden nach einer einmaligen MCT-Injektion eine HcTx ohne PH an Mäusen durch. Sie stellten dabei fest, dass sich auf diese Weise das *Engraftment* der Hepatozyten um das 1,7 bis 2fache erhöhte (Wu, Joseph et al. 2008). Ohne proliferativen Stimulus kam es jedoch nicht zu einer Vermehrung der Zellen *in vivo*. Um der im Voraus nicht absehbaren Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten aus explantierter Leber gerecht zu werden, wurde ein neuartiges Mausmodell der HcTx getestet. Die kurzfristige Gabe von MCT (12 – 24 h vor HcTx) wurde mit einer PH kombiniert, um zusätzlich die Proliferationsfähigkeit der transplantierten Zellen *in vivo* bestimmen zu können.

Über das gesamte Tiermodell hinweg kam es lediglich in der MCT-Gruppe zu Tierverlusten, die vor Versuchsende verstarben oder finalisiert werden mussten. Innerhalb der MCT-Gruppe waren nur Tiere betroffen, die auch Zellen erhalten hatten. Die Anzahl transplantierte Zellen unterschied sich dabei nicht signifikant von den Tieren, bei denen der Versuch erfolgreich abgeschlossen wurde. Möglicherweise stellte die zuvor erfolgte MCT-Injektion eine derartige Vorbelastung für den Organismus dar, dass die kurz darauf folgende Zelltransplantation zu einer hohen Ausfallrate führte. Das Pyrrolizidinalkaloid Monocrotalin schädigt vaskuläre Endothelzellen und wird als anerkanntes Modell für

pulmonale Hypertonie bei der Ratte eingesetzt (Stenmark, Meyrick et al. 2009). Die schädigende Wirkung bei der Maus gilt diesbezüglich jedoch als umstritten. Wu et al. konnten nach einmaliger Applikation von 200 mg/kg MCT weder durch blutchemische Untersuchungen noch durch histologische oder elektronenmikroskopische Bilder eine Schädigung der Hepatozyten in der Maus nachweisen (Wu, Joseph et al. 2008).

Im Zuge der Nachweisführung einer erfolgreichen Repopularisierung der Mausleber wurden histologisch deutlich mehr Tiere als positiv identifiziert als dies über die molekulargenetischen Methoden der Fall war. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da die PCR als die sensitivere Methode eingestuft wird. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür liegt in der unterschiedlichen Lokalisation, aus der die Proben für die Immunhistologie und für die PCR genommen wurden.

Da die Histologie zusätzlich eine Beurteilung der Zellen in ihrem Zellverband (Lage und Zellmorphologie) zulässt, wird sie hier im Vergleich zur PCR als die zuverlässigere Nachweismethode über eine erfolgreiche Repopularisierung angesehen. Es wird daher davon ausgegangen, dass die in der Immunhistologie als positiv erkannten Tiere auch tatsächlich erfolgreich mit humanen Hepatozyten repopularisiert wurden. Die Ansiedlung der Zellen fand offensichtlich überwiegend in dem großen medianen Leberlappen statt, aus dem die Proben für die histologischen Untersuchungen gewonnen wurden. Wahrscheinlich führten entsprechende Strömungsvorgänge in den Gefäßen dazu, dass ein Großteil der transplantierten Zellen dort angeschwemmt wurde. In den kleineren rechten und kaudalen Leberlappen, aus denen die Proben für die PCR genommen wurden, gelangten vermutlich nur vergleichsweise wenige transplantierte Zellen. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse der Immunhistologie und der molekulargenetischen Untersuchungen getrennt betrachtet.

Mit Hilfe der Immunhistologie konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Repopularisierung zwischen der MCT-Gruppe und der SHAM-Gruppe festgestellt werden. In beiden Gruppen erfolgte eine Repopularisierung der Mausleber mit humanen Zellen. In der MCT-Gruppe wiesen sieben von sieben Mäusen und in der SHAM-Gruppe sieben von zehn Mäusen humanalbumin-positive Hepatozyten auf.

Mit den molekulargenetischen Methoden ließen sich lediglich in der MCT-Gruppe positive Tiere nachweisen. Dieser Unterschied war signifikant. Es ist somit denkbar, dass das zuvor applizierte MCT den transplantierten Zellen hier das *Engraftment* ermöglichte. Einschränkung muss jedoch beachtet werden, dass die transplantierten Zellen der MCT-Gruppe eine signifikant höhere Viabilität im Vergleich zur SHAM-Gruppe aufwiesen.

Ein wichtiger Marker für den Erfolg dieses Repopularisierungsmodells war die Viabilität der transplantierten Zellen. Die jeweils positiv getesteten Tiere hatten Zellen mit signifikant höherer Viabilität erhalten. Obwohl die Konsensuskonferenz zur humanen Hepatozytentransplantation feststellte, dass es keine gesicherten Daten über die Aussagekraft des TBE gäbe, war er in dieser Arbeit offenbar der entscheidende Faktor für eine erfolgreiche Repopularisierung (Puppi, Strom et al. 2012). Auch innerhalb der MCT-Gruppe konnte eine Tendenz zu höheren Zellviabilitäten bei den erfolgreich transplantierten Tieren beobachtet werden (hAlb:  $p = 0,14$ ; AluS:  $p = 0,057$ ).

Zwar hatten die in der PCR als positiv gewerteten Tiere eine signifikant geringere Zellzahl transplantiert bekommen, jedoch zeigten diese Zellen eine signifikant höhere Viabilität. In einer entsprechend angelegten Studie wurde gezeigt, dass bei der Transplantation unterschiedlicher Hepatozytenzahlen zwischen  $1 \times 10^5$  und  $2 \times 10^6$  kein signifikanter Unterschied in den Repopularisierungsraten auftrat (Haridass, Yuan et al. 2009). Es wird daher auch hier vermutet, dass die besseren Ergebnisse der Repopularisierung auf die höhere Viabilität der Zellen zurückzuführen waren.

Obwohl es nachweislich zu einer Repopularisierung der Mauslebern kam, wurde in keinem Fall im Serum der Tiere humanes Serumalbumin nachgewiesen. Somit konnte der Nachweis der Funktionalität der transplantierten Zellen mit dieser Methode nicht erbracht werden. Die wahrscheinlichste Erklärung hierfür ist, dass die untere Nachweisgrenze des verwendeten Analyseverfahrens nicht erreicht wurde. In einer ähnlich aufgebauten Studie wurden Albuminwerte um 2,5 – 3 ng/ml gemessen (Joshi, P et al. 2012). Die untere Nachweisgrenze des hier eingesetzten Albumin ELISA kits betrug jedoch 1,5 µg/ml.

Aus den oben genannten Gründen war eine abschließende Beurteilung über den Einfluss des applizierten MCT in diesem Versuch leider nicht möglich. In einem potenziellen erneuten Versuch zu dieser Fragestellung sollte mehr auf die Transplantation von Zellen mit möglichst hoher Viabilität und vergleichbarer Zellzahl geachtet werden. Das Team, welches den Versuch durchführt, sollte bereits Erfahrung mit dem Versuchsablauf aufweisen, um Tierverluste zu minimieren. Bei der Probennahme sollte man sich auf den großen medianen Leberlappen konzentrieren. Zudem sollte in zukünftigen Untersuchungen eine Quantifizierung der humanen Hepatozyten in der Mausleber vorgenommen werden, um die Repopularisierungsrate bestimmen zu können.

## 7 Zusammenfassung

### **Hepatozyten und hepatische Progenitorzellen – Isolierung und Charakterisierung aus humaner, explantierter Leber mit dem Ziel der Zelltransplantation**

Sascha Elisa Belaschk

Das Forschungsprojekt des Neohybriden Lebertransplantates verfolgt das Ziel, die beiden Therapieformen der Lebertransplantation und Leberzelltransplantation miteinander zu verbinden. Durch ein *in vivo* Tissue-Engineering soll eine operationale Toleranz, das heißt das Ausbleiben einer schädigenden, immunologischen Reaktion gegenüber der Spenderleber, induziert werden. Die Grundidee beruht auf einer nach der Organtransplantation durchgeführten Zelltransplantation mit autologen Hepatozyten, welche anschließend die Spenderleber besiedeln. Auf diese Weise soll der Bedarf an immunsuppressiven Medikamenten nach der Lebertransplantation gesenkt werden. Hierfür sollten funktionale Hepatozyten und Leberzellvorläufer aus dem explantierten, hochgradig pathologisch veränderten Lebergewebe der Organspendeempfänger gewonnen und auf ihre Eignung für die Zelltransplantation geprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ergebnisse der Zellisolierung aus 23 erkrankten, explantierten Lebern und 14 Leberteileresektaten aus unverändertem Lebergewebe von menschlichen Patienten miteinander verglichen. Die Hepatozyten wurden in Kultur auf ihre Viabilität und metabolische Aktivität getestet und zudem einer Kühlung über bis zu 48 Stunden unterzogen. Die Nichtparenchymale Zellfraktion wurde mittels Durchflusszytometrie charakterisiert und zwei Anreicherungsverfahren für Leberzellvorläufer getestet. Zudem wurde ein neuartiges Mausmodell entwickelt, mit dem nachfolgend die Eignung der Hepatozyten aus explantiertem Lebergewebe für die Zelltransplantation geprüft werden soll.

Trotz des jeweils klinisch manifesten Leberversagens, welches die Durchführung einer Lebertransplantation notwendig machte, konnten aus den explantierten Lebern funktionale Hepatozyten isoliert und kultiviert werden. Die Isolierungsergebnisse unterschieden sich dabei nicht signifikant von denen aus unverändertem Lebergewebe. Auch bezüglich ihrer Viabilität und metabolischen Aktivität in der Zellkultur waren die Unterschiede zwischen den Hepatozyten aus erkrankter, explantierter Leber und dem unveränderten Gewebe der Leberteileresektate gering. Tatsächlich gab es sogar Anhaltspunkte, dass die Zellen aus erkranktem Lebergewebe in der Langzeitkultur stabiler sind. Die Kühlung der isolierten Hepatozyten über 24 und 48 Stunden konnte mit akzeptablen Verlusten der Zellviabilität durchgeführt werden. Die beiden getesteten Lagerungsmedien ChillProtec<sup>®</sup> und ChillProtec<sup>®</sup> plus unterschieden sich dabei nur geringfügig. Auch hier gab es Hinwei-

se auf eine bessere Stabilität der Hepatozyten aus erkranktem, explantiertem Lebergewebe.

Die Nichtparenchymale Zellfraktion wurde zunächst auf das Vorhandensein des Glykoproteins EpCAM, einem bekannten Oberflächenmarker für hepatische Progenitorzellen, und auf den Leukozytenmarker CD45 überprüft. Die Nichtparenchymale Zellfraktion erkrankter, explantierter Lebern enthielt dabei tendentiell mehr EpCAM-positive Zellen als die der Leberteileresektate. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Im Rahmen weiterer Färbungen erwiesen sich die EpCAM-positiven Zellen zugleich als CD133/1-positiv, was die Annahme unterstützt, dass es sich dabei um potentielle Leberzellvorläufer handelte. Die EpCAM- und CD45-negative Zellfraktion, welche etwa die Hälfte der Nichtparenchymalen Zellfraktion ausmachte, enthielt bei erkrankten, explantierten Lebern signifikant mehr CD90-positive Zellen als bei Leberteileresektaten. Auch CD90 gilt als Marker für hepatische Progenitorzellen, so dass es sich bei diesen Zellen ebenfalls um potentielle Vorläufer für Hepato- und Cholangiozyten handelte.

Die anschließend getesteten Anreicherungsverfahren mittels OptiPrep<sup>™</sup>-Dichtegradientenzentrifugation und Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS<sup>®</sup>) zur Gewinnung von Leberzellvorläufern für die Zelltransplantation erwiesen sich als ungeeignet.

Mit dem neuartigen, für das Projekt optimierten Mausmodell ließen sich erfolgreich humane Hepatozyten aus Leberteileresektaten in der Mausleber ansiedeln. Es stellte sich heraus, dass die Viabilität der zu transplantierenden Zellen offensichtlich eine wichtige Rolle für den Repopularisierungserfolg spielt. Zudem wurden Fehlerquellen bei der Durchführung und Auswertung des Modells identifiziert, um dessen geplante Anwendung für Zellen aus explantierter Leber zu optimieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die These, dass Hepatozyten aus erkranktem, explantiertem Lebergewebe für die Verwendung bei der Hepatozytentransplantation geeignet sein könnten. Es gab deutliche Hinweise dafür, dass aus hochgradig erkrankter Leber eine ausreichende Anzahl an Leberzellvorläufern für die Zelltransplantation isoliert werden kann. Beide Zelltypen müssen nun auf ihre repopulativen Eigenschaften hin untersucht werden, wofür sich das hier etablierte Mausmodell als geeignet erwies. Mit Hilfe des Projektes „Neohybrides Lebertransplantat“ soll lebertransplantierten Menschen eine längere Überlebenszeit bei höherer Lebensqualität gewährleistet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Aussichten auf eine Realisierung dieses Projektes.

## 8 Summary

### **Hepatocytes and Hepatic Progenitor Cells – Isolation and Characterization from Explanted Human Liver with the Objective of Cell Transplantation**

Sascha Elisa Belaschk

The basic idea of the Neo-Hybrid Liver Graft project is to combine the two therapeutic options of liver transplantation and liver cell transplantation. The final objective is to develop a new concept of *in vivo* tissue engineering of the liver by performing a cell transplantation of autologous hepatocytes after an orthotopic liver transplantation has been conducted. This is anticipated to induce a partial or complete absence of detrimental immune response towards the allogeneic liver graft, called operational tolerance, and consequently reduce the need for immunosuppressants. For this purpose functional hepatocytes and hepatic progenitor cells from explanted, diseased human livers were isolated and examined with regard to their suitability for cell transplantation.

Hepatocyte isolations from sections of 23 explanted diseased human livers were carried out and compared to the results of 14 isolations from normal liver tissue after partial hepatectomy. The hepatocytes were cultured and examined for their viability and metabolic activity. Additionally, the cells were stored at 4°C for up to 48 hours to analyze stability during cold storage. The non parenchymal cell fraction was characterized by flow cytometry and two methods for liver progenitor cell enrichment were tested. Furthermore, a new mouse model of liver cell transplantation was developed with the intent to later test the repopulative capacity of hepatocytes from diseased, explanted liver tissue.

Despite of a clinically confirmed liver failure as an indication of orthotopic liver transplantation, fully functional hepatocytes from explanted liver tissue could be successfully isolated and cultivated. Moreover, no significant difference to the isolation outcome of healthy liver tissue could be found. In hepatocyte cultures only minor differences in viability and metabolic activity could be observed between cells from diseased and healthy liver tissue. Indeed, hepatocytes from diseased, explanted liver tissue appeared to be more robust in long term culture. The cold storage of hepatocytes for 24 and 48 hours resulted in acceptable losses of cell viability, which differed only slightly between the two tested storage media ChillProtec® and ChillProtec® plus. Again, hepatocytes from diseased liver tended to be more robust than those from healthy liver tissue.

The non parenchymal cell fractions were initially tested for the cell surface protein EpCAM, a known marker of hepatic progenitor cells, and for the leucocyte marker CD45. The non parenchymal cell fraction of diseased, explanted liver tissue contained more EpCAM-positive cells than those obtained from partial liver resections. However, these differences were not statistically significant. The majority of EpCAM-positive cells turned out to be also positive for the surface marker CD133/1, confirming the phenotype of

progenitor cells. Making up about half of the non parenchymal cells the EpCAM- and CD45-negative cell fraction of diseased, explanted livers contained significantly more CD90-positive cells than those of partial liver resections. These cells also represented potential progenitors of hepato- or cholangiocytes as CD90 has been repeatedly described as a marker of hepatic progenitor cells.

Subsequent enrichment of these potential progenitor cells for immediate cell transplantation by the means of OptiPrep™ density gradient centrifugation or magnetic-activated cell sorting (MACS®) proved to be inappropriate.

The new mouse model for liver cell transplantation, which had been optimized to fit this project, showed successful engraftment of human hepatocytes isolated from normal tissue of partial liver resections. Above all, the viability of cells at the time of transplantation turned out to play an important role for successful engraftment. Potential sources of error during execution and analysis of the model have been assessed in order to optimize its scheduled application with hepatocytes from diseased, explanted liver.

Altogether, the results presented here support the hypothesis that hepatocytes from diseased, explanted human livers represent an adequate cell source for hepatocyte transplantation. Moreover, there was evidence that a sufficient number of hepatic progenitor cells can be isolated from diseased liver for cell transplantation. Both cell types now need to be tested for their repopulative capacity using the newly developed mouse model.

The Neo-Hybrid Liver Graft project aims to extend survival time and improve quality of life of people undergoing orthotopic liver transplantation. The hereby presented results support the feasibility of the concept.

## 9 Literaturverzeichnis

Adam R, Hoti E (2009): Liver transplantation: the current situation. *Semin Liver Dis* 29(1), 3-18

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, Rodriguez FS, Burroughs A (2012): Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol* 57(3), 675-88

Agopian VG, Kaldas FM, Hong JC, Whittaker M, Holt C, Rana A, Zarrinpar A, Petrowsky H, Farmer D, Yersiz H, Xia V, Hiatt JR, Busuttil RW (2012): Liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis: the new epidemic. *Ann Surg* 256(4), 624-33

Akkina R (2013): New generation humanized mice for virus research: comparative aspects and future prospects. *Virology* 435(1), 14-28

Alison MR (1986): Regulation of hepatic growth. *Physiol Rev* 66(3), 499-541

Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W (2008): Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 14(5), 688-94

Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer BW, Cohen Y, Loewenthal R, Trakhtenbrot L, Paz N, Koren-Michowitz M, Waldman D, Leider-Trejo L, Toren A, Constantini S, Rechavi G (2009): Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6(2), e1000029

Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH (1977): The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull World Health Organ* 55(4), 521-40

Aupet S, Simone G, Heyd B, Bachellier P, Vidal I, Richert L, Martin H (2013): Isolation of viable human hepatic progenitors from adult livers is possible even after 48 hours of cold ischemia. *Tissue Eng Part C Methods* 19(7), 497-506

Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B (2007): Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56(3), 405-15

Aydinli M, Bayraktar Y (2007): Budd-Chiari syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis. *World J Gastroenterol* 13(19), 2693-6

Azuma H, Paulk N, Ranade A, Dorrell C, Al-Dhalimy M, Ellis E, Strom S, Kay MA, Finegold M, Grompe M (2007): Robust expansion of human hepatocytes in *Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup>* mice. *Nat Biotechnol* 25(8), 903-10

Bachir NM, Larson AM (2012): Adult liver transplantation in the United States. *Am J Med Sci* 343(6), 462-9

Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, Bosco D, Peyrou M, Clement S, Sgroi A, Kaelin A, Buhler LH, Gonelle-Gispert C (2009): Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* 4(8), e6657

Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV (1999): The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med (Berl)* 77(10), 699-712

Barker TH, Hagood JS (2009): Getting a grip on Thy-1 signaling. *Biochim Biophys Acta* 1793(5), 921-3

Bartlett DC, Hodson J, Bhogal RH, Youster J, Newsome PN (2014): Combined use of N-acetylcysteine and Liberase improves the viability and metabolic function of human hepatocytes isolated from human liver. *Cytotherapy* 16(6), 800-9

- Bernal W, Wendon J (2013): Acute liver failure. *N Engl J Med* 369(26), 2525-34
- Berry MN, Friend DS (1969): High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43(3), 506-20
- Bhogal RH, Hodson J, Bartlett DC, Weston CJ, Curbishley SM, Haughton E, Williams KT, Reynolds GM, Newsome PN, Adams DH, Afford SC (2011): Isolation of primary human hepatocytes from normal and diseased liver tissue: a one hundred liver experience. *PLoS One* 6(3), e18222
- Bischof M, Ito-Jung S, Mullhaupt B (2013): [Acute liver failure]. *Praxis (Bern 1994)* 102(20), 1217-26; quiz 1225
- Boberg KM, Aadland E, Jahnsen J, Raknerud N, Stiris M, Bell H (1998): Incidence and prevalence of primary biliary cirrhosis, primary sclerosing cholangitis, and autoimmune hepatitis in a Norwegian population. *Scand J Gastroenterol* 33(1), 99-103
- Bohne F, Martinez-Llordella M, Lozano JJ, Miquel R, Benitez C, Londono MC, Manzia TM, Angelico R, Swinkels DW, Tjalsma H, Lopez M, Abraldes JG, Bonaccorsi-Riani E, Jaeckel E, Taubert R, Pirenne J, Rimola A, Tisone G, Sanchez-Fueyo A (2012): Intra-graft expression of genes involved in iron homeostasis predicts the development of operational tolerance in human liver transplantation. *J Clin Invest* 122(1), 368-82
- Boonstra K, Beuers U, Ponsioen CY (2012): Epidemiology of primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis: a systematic review. *J Hepatol* 56(5), 1181-8
- Boonstra K, van Erpecum KJ, van Nieuwkerk KM, Drenth JP, Poen AC, Witteman BJ, Tuynman HA, Beuers U, Ponsioen CY (2012): Primary sclerosing cholangitis is associated with a distinct phenotype of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 18(12), 2270-6
- Cardinale V, Wang Y, Carpino G, Cui CB, Gatto M, Rossi M, Berloco PB, Cantafora A, Wauthier E, Furth ME, Inverardi L, Dominguez-Bendala J, Ricordi C, Gerber D, Gaudio E, Alvaro D, Reid L (2011): Multipotent stem/progenitor cells in human biliary tree give rise to hepatocytes, cholangiocytes, and pancreatic islets. *Hepatology* 54(6), 2159-72
- Challen GA, Little MH (2006): A side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells* 24(1), 3-12
- Corbeil D, Fargeas CA, Huttner WB (2001): Rat prominin, like its mouse and human orthologues, is a pentaspan membrane glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 285(4), 939-44
- Craig CE, Quaglia A, Selden C, Lowdell M, Hodgson H, Dhillon AP (2004): The histopathology of regeneration in massive hepatic necrosis. *Semin Liver Dis* 24(1), 49-64
- Crane LJ, Miller DL (1983): Plasma protein induction by isolated hepatocytes. *Mol Cell Biochem* 53-54(1-2), 89-109
- Crawford JM (2002): Liver cirrhosis  
In: *Pathology of the liver / Hrsg.: MacSween RNM, Burt AD and Portmann BC - London: Elsevier Limited*
- Crosby HA, Hubscher S, Fabris L, Joplin R, Sell S, Kelly D, Strain AJ (1998): Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* 152(3), 771-9
- Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ (2001): Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 120(2), 534-44
- Custer RP, Bosma GC, Bosma MJ (1985): Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse. *Pathology, reconstitution, neoplasms. Am J Pathol* 120(3), 464-77

Dancygier H (2003): Primäre Tumoren der Leber

In: Klinische Hepatologie / Hrsg.: Dancygier H - Heidelberg: Springer Verlag

Dancygier H, Frühauf H, Sarrazin C, Sarrazin U, Zeuzem S (2003): Infektiöse Lebererkrankungen

In: Klinische Hepatologie / Hrsg.: Dancygier H - Heidelberg: Springer Verlag

Dandri M, Burda MR, Torok E, Pollok JM, Iwanska A, Sommer G, Rogiers X, Rogler CE, Gupta S, Will H, Greten H, Petersen J (2001): Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33(4), 981-8

Darwiche H, Petersen BE (2010): Biology of the adult hepatic progenitor cell: "ghosts in the machine". *Prog Mol Biol Transl Sci* 97, 229-49

de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV (1999): Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver. *J Pathol* 188(2), 201-6

De Vos R, Desmet V (1992): Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* 140(6), 1441-50

Devlin J, Doherty D, Thomson L, Wong T, Donaldson P, Portmann B, Williams R (1998): Defining the outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Hepatology* 27(4), 926-33

Dezso K, Jelnes P, Laszlo V, Baghy K, Bodor C, Paku S, Tygstrup N, Bisgaard HC, Nagy P (2007): Thy-1 is expressed in hepatic myofibroblasts and not oval cells in stem cell-mediated liver regeneration. *Am J Pathol* 171(5), 1529-37

Dhawan A, Strom SC, Sokal E, Fox IJ (2010): Human hepatocyte transplantation. *Methods Mol Biol* 640, 525-34

Dolle L, Best J, Mei J, Al Battah F, Reynaert H, van Grunsven LA, Geerts A (2010): The quest for liver progenitor cells: a practical point of view. *J Hepatol* 52(1), 117-29

Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Castell JV (1993): A microassay for measuring cytochrome P450IA1 and P450IIB1 activities in intact human and rat hepatocytes cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 213(1), 29-33

Donckier V, Troisi R, Le Moine A, Toungouz M, Ricciardi S, Colle I, Van Vlierberghe H, Craciun L, Libin M, Praet M, Noens L, Stordeur P, Andrien M, Lambermont M, Gelin M, Bourgeois N, Adler M, de Hemptinne B, Goldman M (2006): Early immunosuppression withdrawal after living donor liver transplantation and donor stem cell infusion. *Liver Transpl* 12(10), 1523-8

Donckier V, Troisi R, Toungouz M, Colle I, Van Vlierberghe H, Jacquy C, Martiat P, Stordeur P, Zhou L, Boon N, Lambermont M, Schandene L, Van Laethem JL, Noens L, Gelin M, de Hemptinne B, Goldman M (2004): Donor stem cell infusion after non-myeloablative conditioning for tolerance induction to HLA mismatched adult living-donor liver graft. *Transpl Immunol* 13(2), 139-46

Drenckhahn D, Fahimi D (2008): Leber und Gallenblase

In: Anatomie / Hrsg.: Benninghoff A and Drenckhahn D - München: Elsevier

Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Ramadori G (2009): Thy-1 is expressed in myofibroblasts but not found in hepatic stellate cells following liver injury. *Histochem Cell Biol* 131(1), 115-27

Dudas J, Mansuroglu T, Batusic D, Saile B, Ramadori G (2007): Thy-1 is an in vivo and in vitro marker of liver myofibroblasts. *Cell Tissue Res* 329(3), 503-14

Duncan AW, Dorrell C, Grompe M (2009): Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* 137(2), 466-81

- Dunkel A, Waage P (2013):  
Organspende und Transplantation in Deutschland, Jahresbericht 2013. Blome B.
- Duret C, Gerbal-Chaloin S, Ramos J, Fabre JM, Jacquet E, Navarro F, Blanc P, Sa-Cunha A, Maurel P, Daujat-Chavanieu M (2007): Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver. *Stem Cells* 25(7), 1779-90
- EI-Serag HB (2011): Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 365(12), 1118-27
- ELTR (2014): European Liver Transplant Registry  
Abgerufen am: 28.02.2014, [www.eltr.org](http://www.eltr.org)
- Ferral H, Behrens G, Lopera J (2012): Budd-Chiari syndrome. *AJR Am J Roentgenol* 199(4), 737-45
- Fisher RA, Strom SC (2006): Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* 82(4), 441-9
- Forman LM, Lewis JD, Berlin JA, Feldman HI, Lucey MR (2002): The association between hepatitis C infection and survival after orthotopic liver transplantation. *Gastroenterology* 122(4), 889-96
- Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC (1998): Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338(20), 1422-6
- Fuller BJ, Petrenko AY, Rodriguez JV, Somov AY, Balaban CL, Guibert EE (2013): Biopreservation of hepatocytes: current concepts on hypothermic preservation, cryopreservation, and vitrification. *Cryo Letters* 34(4), 432-52
- Furukawa H, Todo S (2004): Evolution of immunosuppression in liver transplantation: contribution of cyclosporine. *Transplant Proc* 36(2 Suppl), 274S-284S
- Ganz M, Szabo G (2013): Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatology* 57(2 Suppl), 771-781
- Gerbal-Chaloin S, Duret C, Raulet E, Navarro F, Blanc P, Ramos J, Maurel P, Daujat-Chavanieu M (2010): Isolation and culture of adult human liver progenitor cells: in vitro differentiation to hepatocyte-like cells. *Methods Mol Biol* 640, 247-60
- Gerbal-Chaloin S, Funakoshi N, Caillaud A, Gondeau C, Champon B, Si-Tayeb K (2014): Human induced pluripotent stem cells in hepatology: beyond the proof of concept. *Am J Pathol* 184(2), 332-47
- Gilgenkrantz H (2010): Rodent models of liver repopulation. *Methods Mol Biol* 640, 475-90
- Girlanda R, Rela M, Williams R, O'Grady JG, Heaton ND (2005): Long-term outcome of immunosuppression withdrawal after liver transplantation. *Transplant Proc* 37(4), 1708-9
- Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, Andersen ME, Ansari N, Bhattacharya S, Bode JG, Bolleyn J, Borner C, Bottger J, Braeuning A, Budinsky RA, Burkhardt B, Cameron NR, Camussi G, Cho CS, Choi YJ, Craig Rowlands J, Dahmen U, Damm G, Dirsch O, Donato MT, Dong J, Dooley S, Drasdo D, Eakins R, Ferreira KS, Fonsato V, Fraczek J, Gebhardt R, Gibson A, Glanemann M, Goldring CE, Gomez-Lechon MJ, Groothuis GM, Gustavsson L, Guyot C, Hallifax D, Hammad S, Hayward A, Haussinger D, Hellerbrand C, Hewitt P, Hoehme S, Holzhutter HG, Houston JB, Hrach J, Ito K, Jaeschke H, Keitel V, Kelm JM, Kevin Park B, Kordes C, Kullak-Ublick GA, LeCluyse EL, Lu P, Luebke-Wheeler J, Lutz A, Maltman DJ, Matz-Soja M, McMullen P, Merfort I, Messner S, Meyer C, Mwinyi J, Naisbitt DJ, Nussler AK, Olinga P, Pampaloni F, Pi J, Pluta L, Przyborski SA, Ramachandran A, Rogiers V, Rowe C, Schelcher C, Schmich K, Schwarz M, Singh B, Stelzer EH, Stieger B, Stober R, Sugiyama Y, Tetta C, Thasler WE, Vanhaecke T, Vinken M, Weiss TS, Widera A, Woods CG, Xu JJ, Yarborough KM, Hengstler JG (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(8), 1315-530

Gramignoli R, Dorko K, Tahan V, Skvorak KJ, Ellis E, Jorns C, Ericzon BG, Fox IJ, Strom SC (2014): Hypothermic storage of human hepatocytes for transplantation. *Cell Transplant* 23(9), 1143-51

Gramignoli R, Tahan V, Dorko K, Skvorak KJ, Hansel MC, Zhao W, Venkataramanan R, Ellis EC, Jorns C, Ericzon BG, Rosenborg S, Kuiper R, Soltys KA, Mazariegos GV, Fox IJ, Wilson EM, Grompe M, Strom SC (2013): New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants. *Stem Cell Res* 11(1), 563-73

Granot E, Loewenthal R, Jakobovich E, Gazit E, Sokal E, Reding R (2012): Living related liver transplant following bone marrow transplantation from same donor: long-term survival without immunosuppression. *Pediatr Transplant* 16(1), E1-4

Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE (2002): Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation* 73(11), 1818-24

Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM (1999): Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 29(2), 509-19

Gupta S, Vemuru RP, Lee CD, Yerneni PR, Aragona E, Burk RD (1994): Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 5(8), 959-67

Gupta S, Yerneni PR, Vemuru RP, Lee CD, Yellin EL, Bhargava KK (1993): Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation: relevance to ex vivo gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum Gene Ther* 4(3), 249-57

Hall PA (1989): What are stem cells and how are they controlled? *J Pathol* 158(4), 275-7

Han B, Lu Y, Meng B, Qu B (2009): Cellular loss after allogenic hepatocyte transplantation. *Transplantation* 87(1), 1-5

Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M, Narain N, Bock M, Norder M, Legrand N, Wedemeyer H, Weijer K, Spits H, Manns MP, Cai J, Deng H, Di Santo JP, Guzman CA, Ott M (2009): Repopulation efficiencies of adult hepatocytes, fetal liver progenitor cells, and embryonic stem cell-derived hepatic cells in albumin-promoter-enhancer urokinase-type plasminogen activator mice. *Am J Pathol* 175(4), 1483-92

Hata K, Zhang XR, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Herberman RB, Whiteside TL (1990): Isolation, phenotyping, and functional analysis of lymphocytes from human liver. *Clin Immunol Immunopathol* 56(3), 401-19

Häussinger D, Löffler G (2007): *Leber*

In: *Biochemie und Pathobiochemie* / Hrsg.: Löffler G, Petrides PE and Heinrich PC - Heidelberg: Springer Medizin Verlag

He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF (2004): Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* 37(2), 177-87

Heneghan MA, Yeoman AD, Verma S, Smith AD, Longhi MS (2013): Autoimmune hepatitis. *Lancet* 382(9902), 1433-44

Henne-Bruns D (2003): *Duale Reihe Chirurgie, 2. Auflage* - Stuttgart: Thieme Verlag.

- Hering E (1867): Über den Bau der Wirbelthierleber. *Archiv für mikroskopische Anatomie*(3), 88-118
- Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G (2006): Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 24(12), 2840-50
- Herzer K, Paul A, Gerken G (2013): [Liver transplantation--an update]. *Dtsch Med Wochenschr* 138(28-29), 1471-7
- Hirschfield GM, Karlsen TH, Lindor KD, Adams DH (2013): Primary sclerosing cholangitis. *Lancet* 382(9904), 1587-99
- Howard RB, Christensen AK, Gibbs FA, Pesch LA (1967): The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *J Cell Biol* 35(3), 675-84
- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A (2012): Current status of hepatocyte transplantation. *Transplantation* 93(4), 342-7
- Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lehec SC, Girlanda R, Rela M, Heaton ND, Muiesan P (2006): Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl* 12(5), 713-7
- Ilyas JA, O'Mahony CA, Vierling JM (2011): Liver transplantation in autoimmune liver diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 25(6), 765-82
- Irollo E, Pirozzi G (2013): CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res* 5(6), 563-81
- Jiang L, Li JG, Lan L, Wang YM, Mao Q, You JP (2010): Human hepatoma HepaRG cell line engraftment in severe combined immunodeficient x beige mice using mouse-specific anti-Fas antibody. *Transplant Proc* 42(9), 3773-8
- Jorns C, Gramignoli R, Saliem M, Zemack H, Mork LM, Isaksson B, Nowak G, Ericzon BG, Strom S, Ellis E (2014): Strategies for short-term storage of hepatocytes for repeated clinical infusions. *Cell Transplant* 23(8), 1009-18
- Joseph B, Kumaran V, Berishvili E, Bhargava KK, Palestro CJ, Gupta S (2006): Monocrotaline promotes transplanted cell engraftment and advances liver repopulation in rats via liver conditioning. *Hepatology* 44(6), 1411-20
- Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S (2002): Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* 123(5), 1677-85
- Joshi M, P BP, He Z, Holgersson J, Olausson M, Sumitran-Holgersson S (2012): Fetal liver-derived mesenchymal stromal cells augment engraftment of transplanted hepatocytes. *Cytotherapy*
- Jozefczuk J, Stachelscheid H, Chavez L, Herwig R, Lehrach H, Zeilinger K, Gerlach JC, Adjaye J (2010): Molecular characterization of cultured adult human liver progenitor cells. *Tissue Eng Part C Methods* 16(5), 821-34
- Jungst C, Lammert F, Strassburg CP (2013): [Autoimmune hepatitis]. *Dtsch Med Wochenschr* 138(50), 2599-608; quiz 2609-12
- Katenz E, Vondran FW, Schwartlander R, Pless G, Gong X, Cheng X, Neuhaus P, Sauer IM (2007): Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl* 13(1), 38-45
- Kawahara T, Toso C, Douglas DN, Nourbakhsh M, Lewis JT, Tyrrell DL, Lund GA, Churchill TA, Kneteman NM (2010): Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl* 16(8), 974-82

- Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao P, Pande G, Narasu ML, Khaja MN, Pramila R, Habeeb A, Habibullah CM (2008a): Management of hyperbilirubinemia in biliary atresia by hepatic progenitor cell transplantation through hepatic artery: a case report. *Transplant Proc* 40(4), 1153-5
- Khan AA, Parveen N, Mahaboob VS, Rajendraprasad A, Ravindrakrishna HR, Venkateswarlu J, Rao P, Pande G, Narasu ML, Khaja MN, Pramila R, Habeeb A, Habibullah CM (2008b): Treatment of Crigler-Najjar Syndrome type 1 by hepatic progenitor cell transplantation: a simple procedure for management of hyperbilirubinemia. *Transplant Proc* 40(4), 1148-50
- Khan AA, Shaik MV, Parveen N, Rajendraprasad A, Aleem MA, Habeeb MA, Srinivas G, Raj TA, Tiwari SK, Kumaresan K, Venkateswarlu J, Pande G, Habibullah CM (2010): Human fetal liver-derived stem cell transplantation as supportive modality in the management of end-stage decompensated liver cirrhosis. *Cell Transplant* 19(4), 409-18
- Khuu DN, Najimi M, Sokal EM (2007): Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? *World J Gastroenterol* 13(10), 1554-60
- Kim N, Cho SG (2013): Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean J Intern Med* 28(4), 387-402
- Kim SJ, Park KC, Lee JU, Kim KJ, Kim DG (2011): Therapeutic potential of adipose tissue-derived stem cells for liver failure according to the transplantation routes. *J Korean Surg Soc* 81(3), 176-86
- Kleine M, Riemer M, Krech T, DeTemple D, Jager MD, Lehner F, Manns MP, Klempnauer J, Borlak J, Bektas H, Vondran FW (2014): Explanted diseased livers - a possible source of metabolic competent primary human hepatocytes. *PLoS One* 9(7), e101386
- Knobeloch D, Ehnert S, Schyschka L, Buchler P, Schoenberg M, Kleeff J, Thasler WE, Nussler NC, Godoy P, Hengstler J, Nussler AK (2012): Human hepatocytes: isolation, culture, and quality procedures. *Methods Mol Biol* 806, 99-120
- Kobayashi N, Fujiwara T, Westerman KA, Inoue Y, Sakaguchi M, Noguchi H, Miyazaki M, Cai J, Tanaka N, Fox IJ, LeBoulch P (2000): Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* 287(5456), 1258-62
- Kordes C, Haussinger D (2013): Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest* 123(5), 1874-80
- Kordes C, Sawitzka I, Gotze S, Haussinger D (2012): Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration. *PLoS One* 7(12), e51878
- Kordes C, Sawitzka I, Muller-Marbach A, Ale-Agha N, Keitel V, Klonowski-Stumpe H, Haussinger D (2007): CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352(2), 410-7
- Kornberg A, Matevossian E, Bogdanski R, Umgelter A, Witt U, Blobner M, Schmid RM, Friess H (2012): Die Lebertransplantation in Zeiten der MELD-Ära. *kliniker* 41(6+7), 304-308
- Kuver R, Savard CE, Lee SK, Haigh WG, Lee SP (2007): Murine gallbladder epithelial cells can differentiate into hepatocyte-like cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293(5), G944-55
- Kuwahara R, Kofman AV, Landis CS, Swenson ES, Barendsward E, Theise ND (2008): The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* 47(6), 1994-2002
- Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA (1998): Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 153(1), 319-29

- Laconi S, Pillai S, Porcu PP, Shafritz DA, Pani P, Laconi E (2001): Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 158(2), 771-7
- Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y, Cui CB, Carpino G, Cardinale V, Gerber D, Gabriel M, Dominguez-Bendala J, Furth ME, Gaudio E, Alvaro D, Inverardi L, Reid LM (2013): Clinical Programs of Stem Cell Therapies for Liver and Pancreas. *Stem Cells*
- Laurson J, Selden C, Clements M, Mavri-Damelin D, Coward S, Lowdell M, Hodgson HJ (2007): Putative human liver progenitor cells in explanted liver. *Cells Tissues Organs* 186(3), 180-91
- Lee J, Belanger A, Doucette JT, Stanca C, Friedman S, Bach N (2007): Transplantation trends in primary biliary cirrhosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5(11), 1313-5
- Leung AYH, Verfaillie CM (2005): Stem cell model of hematopoiesis  
In: *Hematology / Hrsg.: Hoffmann R, Benz Jr. EJ, Shattil SJet al - Philadelphia: Elsevier Inc.*
- Levitsky J (2011): Operational tolerance: past lessons and future prospects. *Liver Transpl* 17(3), 222-32
- Litvinov SV, Bakker HA, Gourevitch MM, Velders MP, Warnaar SO (1994): Evidence for a role of the epithelial glycoprotein 40 (Ep-CAM) in epithelial cell-cell adhesion. *Cell Adhes Commun* 2(5), 417-28
- Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO (1994): Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol* 125(2), 437-46
- Liu XQ, Hu ZQ, Pei YF, Tao R (2013): Clinical operational tolerance in liver transplantation: state-of-the-art perspective and future prospects. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 12(1), 12-33
- Macdonald RA (1961): "Lifespan" of liver cells. Autoradio-graphic study using tritiated thymidine in normal, cirrhotic, and partially hepatectomized rats. *Arch Intern Med* 107, 335-43
- Malhi H, Annamaneni P, Slehria S, Joseph B, Bhargava KK, Palestro CJ, Novikoff PM, Gupta S (2002): Cyclophosphamide disrupts hepatic sinusoidal endothelium and improves transplanted cell engraftment in rat liver. *Hepatology* 36(1), 112-21
- Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC (2000): A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology* 31(4), 864-71
- Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M (2003): Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 37(4), 917-23
- Marongiu F, Gramignoli R, Dorko K, Miki T, Ranade AR, Paola Serra M, Doratiotto S, Sini M, Sharma S, Mitamura K, Sellaro TL, Tahan V, Skvorak KJ, Ellis EC, Badylak SF, Davila JC, Hines R, Laconi E, Strom SC (2011): Hepatic differentiation of amniotic epithelial cells. *Hepatology* 53(5), 1719-29
- Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P (2008): Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int* 28(1), 3-11
- Masson NM, Currie IS, Terrace JD, Garden OJ, Parks RW, Ross JA (2006): Hepatic progenitor cells in human fetal liver express the oval cell marker Thy-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291(1), G45-54
- Meyerrose TE, Herrbrich P, Hess DA, Nolte JA (2003): Immune-deficient mouse models for analysis of human stem cells. *Biotechniques* 35(6), 1262-72
- Michalopoulos GK (2007): Liver regeneration. *J Cell Physiol* 213(2), 286-300

- Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A (1998): Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 4(10), 1185-8
- Murphy K, Travers P, Walport M (2009): *Janeway Immunologie*, 7. Auflage - Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nakatani K, Seki S, Kawada N, Kobayashi K, Kaneda K (1996): Expression of neural cell adhesion molecule (N-CAM) in perisinusoidal stellate cells of the human liver. *Cell Tissue Res* 283(1), 159-65
- Nebbrig M, Neuhaus P, Pascher A (2014): Advances in the management of the explanted donor liver. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(8), 489-96
- Neubauer K, Wilfling T, Ritzel A, Ramadori G (2000): Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene expression in liver sinusoidal endothelial cells during liver injury and repair. *J Hepatol* 32(6), 921-32
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F (2000): Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17), 5421-6
- Ochsner SA, Strick-Marchand H, Qiu Q, Venable S, Dean A, Wilde M, Weiss MC, Darlington GJ (2007): Transcriptional profiling of bipotential embryonic liver cells to identify liver progenitor cell surface markers. *Stem Cells* 25(10), 2476-87
- Ono Y, Kawachi S, Hayashida T, Wakui M, Tanabe M, Itano O, Obara H, Shinoda M, Hibi T, Oshima G, Tani N, Mihara K, Kitagawa Y (2011): The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cell populations. *Surgery* 150(2), 154-61
- Orlando G, Manzia T, Baiocchi L, Sanchez-Fueyo A, Angelico M, Tisone G (2008): The Tor Vergata weaning off immunosuppression protocol in stable HCV liver transplant patients: the updated follow up at 78 months. *Transpl Immunol* 20(1-2), 43-7
- Ott M, Schneider A, Attaran M, Manns MP (2006): [Transplantation of hepatocytes in liver failure]. *Dtsch Med Wochenschr* 131(16), 888-91
- Otto G (2013): Liver transplantation: an appraisal of the present situation. *Dig Dis* 31(1), 164-9
- Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M (1997): Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 151(5), 1273-80
- Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M (1996): Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* 12(3), 266-73
- Panchision DM, Chen HL, Pistollato F, Papini D, Ni HT, Hawley TS (2007): Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells* 25(6), 1560-70
- Pascher A, Nebbrig M, Neuhaus P (2013): Irreversible liver failure: treatment by transplantation: part 3 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int* 110(10), 167-73
- Pascher A, Sauer IM, Walter M, Lopez-Haeninnen E, Theruvath T, Spinelli A, Neuhaus R, Settmacher U, Mueller AR, Steinmueller T, Neuhaus P (2002): Donor evaluation, donor risks, donor outcome, and donor quality of life in adult-to-adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl* 8(9), 829-37
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP (1999): Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284(5417), 1168-70

- Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK (1998): Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* 27(2), 433-45
- Pfitzmann R, Schwenzer J, Rayes N, Seehofer D, Neuhaus R, Nussler NC (2007): Long-term survival and predictors of relapse after orthotopic liver transplantation for alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 13(2), 197-205
- Pichard L, Raulet E, Fabre G, Ferrini JB, Ourlin JC, Maurel P (2006): Human hepatocyte culture. *Methods Mol Biol* 320, 283-93
- Pless G, Sauer IM, Rauen U (2012): Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant* 21(1), 23-37
- Pons JA, Ramirez P, Revilla-Nuin B, Pascual D, Baroja-Mazo A, Robles R, Sanchez-Bueno F, Martinez L, Parrilla P (2009): Immunosuppression withdrawal improves long-term metabolic parameters, cardiovascular risk factors and renal function in liver transplant patients. *Clin Transplant* 23(3), 329-36
- Primo J, Maroto N, Martinez M, Anton MD, Zaragoza A, Giner R, Devesa F, Merino C, del Olmo JA (2009): Incidence of adult form of autoimmune hepatitis in Valencia (Spain). *Acta Gastroenterol Belg* 72(4), 402-6
- Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gomez-Lechon MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A (2011): Improving the Techniques for Human Hepatocyte Transplantation: Report from a Consensus Meeting in London. *Cell Transplant*
- Puppi J, Strom SC, Hughes RD, Bansal S, Castell JV, Dagher I, Ellis EC, Nowak G, Ericzon BG, Fox IJ, Gomez-Lechon MJ, Guha C, Gupta S, Mitry RR, Ohashi K, Ott M, Reid LM, Roy-Chowdhury J, Sokal E, Weber A, Dhawan A (2012): Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London. *Cell Transplant* 21(1), 1-10
- Rabes HM, Wirsching R, Tuzcek HV, Iseler G (1976): Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet* 9(6), 517-32
- Rahmel A, Osterlee A (2007): Eurotransplant International Foundation - Annual Report 2007. Leiden, Eurotransplant International Foundation.
- Rao MS, Khan AA, Parveen N, Habeeb MA, Habibullah CM, Pande G (2008): Characterization of hepatic progenitors from human fetal liver during second trimester. *World J Gastroenterol* 14(37), 5730-7
- Raschzok N, Morgul MH, Pinkernelle J, Vondran FW, Billecke N, Kammer NN, Pless G, Adonopoulou MK, Leist C, Stelter L, Teichgraber U, Schwartlander R, Sauer IM (2008): Imaging of primary human hepatocytes performed with micron-sized iron oxide particles and clinical magnetic resonance tomography. *J Cell Mol Med* 12(4), 1384-94
- Raschzok N, Sallmon H, Dame C, Sauer IM (2012): Liver regeneration after partial hepatectomy: inconsistent results of expression screenings for human, mouse, and rat microRNAs. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(4), G470-1
- Ravaioli M, Grazi GL, Ballardini G, Cavrini G, Ercolani G, Cescon M, Zanella M, Cucchetti A, Tuci F, Del Gaudio M, Varotti G, Vetrone G, Trevisani F, Bolondi L, Pinna AD (2006): Liver transplantation with the Meld system: a prospective study from a single European center. *Am J Transplant* 6(7), 1572-7
- Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL (1994): Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 263(5150), 1149-52
- Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL (1995): Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11), 4942-6

- Roder J, Duwe A (1979): The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function. *Nature* 278(5703), 451-3
- Rohn S, Schroeder J, Riedel H, Polenz D, Stanko K, Reutzel-Selke A, Tang P, Brusendorf L, Raschzok N, Neuhaus P, Pratschke J, Sawitzki B, Sauer IM, Mogl MT (2016): Allogeneic Liver Transplantation and Subsequent Syngeneic Hepatocyte Transplantation in a Rat Model: Proof of Concept for in vivo Tissue Engineering. *Cells Tissues Organs*
- Roskams T, De Vos R, van den Oord JJ, Desmet V (1991): Cells with neuroendocrine features in regenerating human liver. *APMIS Suppl* 23, 32-9
- Roskams T, De Vos R, Van Eyken P, Myazaki H, Van Damme B, Desmet V (1998): Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* 29(3), 455-63
- Roskams T, Katoonizadeh A, Komuta M (2010): Hepatic progenitor cells: an update. *Clin Liver Dis* 14(4), 705-18
- Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ (2003): Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 23(4), 385-96
- Russo FP, Parola M (2011): Stem and progenitor cells in liver regeneration and repair. *Cytotherapy* 13(2), 135-44
- Sagias FG, Mitry RR, Hughes RD, Lehec SC, Patel AG, Rela M, Mieli-Vergani G, Heaton ND, Dhawan A (2010): N-acetylcysteine improves the viability of human hepatocytes isolated from severely steatotic donor liver tissue. *Cell Transplant* 19(11), 1487-92
- Saner FH, Cicinnati VR, Sotiropoulos G, Beckebaum S (2012): Strategies to prevent or reduce acute and chronic kidney injury in liver transplantation. *Liver Int* 32(2), 179-88
- Saxena R, Theise N (2004): Canals of Hering: recent insights and current knowledge. *Semin Liver Dis* 24(1), 43-8
- Schmelzer E, Wauthier E, Reid LM (2006): The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* 24(8), 1852-8
- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM (2007): Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 204(8), 1973-87
- Schneider T, Osl F, Friess T, Stockinger H, Scheuer WV (2002): Quantification of human Alu sequences by real-time PCR--an improved method to measure therapeutic efficacy of anti-metastatic drugs in human xenotransplants. *Clin Exp Metastasis* 19(7), 571-82
- Schotanus BA, van den Ingh TS, Penning LC, Rothuizen J, Roskams TA, Spee B (2009): Cross-species immunohistochemical investigation of the activation of the liver progenitor cell niche in different types of liver disease. *Liver Int* 29(8), 1241-52
- Schuppan D, Afdhal NH (2008): Liver cirrhosis. *Lancet* 371(9615), 838-51
- Schwartlander R, Schmid J, Brandenburg B, Katenz E, Vondran FW, Pless G, Cheng X, Pascher A, Neuhaus P, Sauer IM (2007): Continuously microscopically observed and process-controlled cell culture within the SlideReactor: proof of a new concept for cell characterization. *Tissue Eng* 13(1), 187-96
- Schwenger KJ, Allard JP (2014): Clinical approaches to non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 20(7), 1712-23

- Seglen PO (1976): Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83
- Selden C, Chalmers SA, Jones C, Standish R, Quaglia A, Rolando N, Burroughs AK, Rolles K, Dhillon A, Hodgson HJ (2003): Epithelial colonies cultured from human explanted liver in subacute hepatic failure exhibit hepatocyte, biliary epithelial, and stem cell phenotypic markers. *Stem Cells* 21(6), 624-31
- Selmi C, Bowlus CL, Gershwin ME, Coppel RL (2011): Primary biliary cirrhosis. *Lancet* 377(9777), 1600-9
- Smets FN, Chen Y, Wang LJ, Soriano HE (2002): Loss of cell anchorage triggers apoptosis (anoikis) in primary mouse hepatocytes. *Mol Genet Metab* 75(4), 344-52
- Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF (2009): Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6), L1013-32
- Streetz KL (2013): [Liver cell transplantation models for experimental clinical research: Prometheus in a different light?]. *Dtsch Med Wochenschr* 138(16), 852-4
- Struecker B, Raschzok N, Sauer IM (2014): Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11(3), 166-76
- Stutchfield BM, Simpson K, Wigmore SJ (2011): Systematic review and meta-analysis of survival following extracorporeal liver support. *Br J Surg* 98(5), 623-31
- Subba Rao M, Sasikala M, Nageshwar Reddy D (2013): Thinking outside the liver: induced pluripotent stem cells for hepatic applications. *World J Gastroenterol* 19(22), 3385-96
- Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD (2006): Cryopreservation of isolated human hepatocytes for transplantation: State of the art. *Cryobiology* 53(2), 149-59
- Terry C, Dhawan A, Mitry RR, Lehec SC, Hughes RD (2010): Optimization of the cryopreservation and thawing protocol for human hepatocytes for use in cell transplantation. *Liver Transpl* 16(2), 229-37
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS (2000): Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32(1), 11-6
- Tilg H, Moschen AR (2010): Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* 52(5), 1836-46
- Tolosa L, Bonora-Centelles A, Teresa Donato M, Pareja E, Negro A, Lopez S, Castell JV, Jose Gomez-Lechon M (2011): Steatotic liver: a suitable source for the isolation of hepatic progenitor cells. *Liver Int* 31(8), 1231-8
- Tritto G, Davies NA, Jalan R (2012): Liver replacement therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 33(1), 70-9
- Tryphonopoulos P, Tzakis AG, Weppler D, Garcia-Morales R, Kato T, Madariaga JR, Levi DM, Nishida S, Moon J, Selvaggi G, Regev A, Nery C, Bejarano P, Khaled A, Kleiner G, Esquenazi V, Miller J, Ruiz P, Ricordi C (2005): The role of donor bone marrow infusions in withdrawal of immunosuppression in adult liver allotransplantation. *Am J Transplant* 5(3), 608-13
- Tsuchiya A, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Sato Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y (2009): Clinicopathological analysis of CD133 and NCAM human hepatic stem/progenitor cells in damaged livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 39(11), 1080-90
- Turner R, Lozoya O, Wang Y, Cardinale V, Gaudio E, Alpini G, Mendel G, Wauthier E, Barbier C, Alvaro D, Reid LM (2011): Human hepatic stem cell and maturational liver lineage biology. *Hepatology* 53(3), 1035-45
- Valla DC (2009): Primary Budd-Chiari syndrome. *J Hepatol* 50(1), 195-203

- Van Den Heuvel MC, Slooff MJ, Visser L, Muller M, De Jong KP, Poppema S, Gouw AS (2001): Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. *Hepatology* 33(6), 1387-93
- van Keimpema L, Nevens F, Adam R, Porte RJ, Fikatas P, Becker T, Kirkegaard P, Metselaar HJ, Drenth JP (2011): Excellent survival after liver transplantation for isolated polycystic liver disease: an European Liver Transplant Registry study. *Transpl Int* 24(12), 1239-45
- van Oosten M, van de Bilt E, de Vries HE, van Berkel TJ, Kuiper J (1995): Vascular adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression on rat liver cells after lipopolysaccharide administration in vivo. *Hepatology* 22(5), 1538-46
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW (2003): Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 422(6934), 901-4
- Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM (2008): Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs* 32(3), 205-13
- Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M (2002): Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 161(2), 565-74
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M (2003): Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 422(6934), 897-901
- Watt FM, Hogan BL (2000): Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287(5457), 1427-30
- Watt KD, Pedersen RA, Kremers WK, Heimbach JK, Charlton MR (2010): Evolution of causes and risk factors for mortality post-liver transplant: results of the NIDDK long-term follow-up study. *Am J Transplant* 10(6), 1420-7
- Weber ML, Ibrahim HN, Lake JR (2012): Renal dysfunction in liver transplant recipients: evaluation of the critical issues. *Liver Transpl* 18(11), 1290-301
- Weismuller TJ, Negm A, Becker T, Barg-Hock H, Klempnauer J, Manns MP, Strassburg CP (2009): The introduction of MELD-based organ allocation impacts 3-month survival after liver transplantation by influencing pretransplant patient characteristics. *Transpl Int* 22(10), 970-8
- Weiss TS, Lichtenauer M, Kirchner S, Stock P, Aurich H, Christ B, Brockhoff G, Kunz-Schughart LA, Jauch KW, Schlitt HJ, Thasler WE (2008): Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *Gut* 57(8), 1129-38
- Whitehouse T, Wendon J (2013): Acute liver failure. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 27(5), 757-69
- Wiegand J, Berg T (2013): The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int* 110(6), 85-91
- Wiesner RH, Fung JJ (2011): Present state of immunosuppressive therapy in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 17 Suppl 3, S1-9
- Wilson JH, Paturzo FX, Johnson LK, Carreiro MP, Hixson DC, Mennone A, Boyer JL, Pober JS, Harding MJ (2006): Rat hepatocyte engraftment in severe combined immunodeficient x beige mice using mouse-specific anti-fas antibody. *Xenotransplantation* 13(1), 53-62
- Witek RP, Fisher SH, Petersen BE (2005): Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant* 14(1), 41-7

- Wu YM, Joseph B, Berishvili E, Kumaran V, Gupta S (2008): Hepatocyte transplantation and drug-induced perturbations in liver cell compartments. *Hepatology* 47(1), 279-87
- Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Brenner MK, Goodell MA (2003): Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 88(4), 368-78
- Yang L, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi S, Vandongen HM, Huang J, Alpini GD, Diehl AM (2008): Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells* 26(8), 2104-13
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD (2007): Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* 45(1), 139-49
- Yovchev MI, Grozdanov PN, Zhou H, Racherla H, Guha C, Dabeva MD (2008): Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* 47(2), 636-47
- Zagoura DS, Roubelakis MG, Bitsika V, Trohatou O, Pappa KI, Kapelouzou A, Antsaklis A, Anagnostou NP (2011): Therapeutic potential of a distinct population of human amniotic fluid mesenchymal stem cells and their secreted molecules in mice with acute hepatic failure. *Gut*
- Zhang L, Theise N, Chua M, Reid LM (2008): The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 48(5), 1598-607
- Zhou H, Rogler LE, Teperman L, Morgan G, Rogler CE (2007): Identification of hepatocytic and bile ductular cell lineages and candidate stem cells in bipolar ductular reactions in cirrhotic human liver. *Hepatology* 45(3), 716-24
- Zhou XF, Wang Q, Chu JX, Liu AL (2006): Effects of retrorsine on mouse hepatocyte proliferation after liver injury. *World J Gastroenterol* 12(9), 1439-42
- Zhu S, Rezvani M, Harbell J, Mattis AN, Wolfe AR, Benet LZ, Willenbring H, Ding S (2014): Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts. *Nature* 508(7494), 93-7

## 10 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Gliederung der Leber des Menschen in neun Segmente .....	3
Abb. 2-2: Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien von Vorläuferzellen in humaner Leber .....	16
Abb. 2-3: Schema der Erzeugung eines Neohybriden Lebertransplantates.....	25
Abb. 4-1: Leberteilstück einer explantierten Leber zu Beginn der Kanülierung.....	37
Abb. 4-2: Versuchsaufbau der 2-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik.....	39
Abb. 4-3: Schematische Darstellung des <i>Cold Storage</i> Versuches .....	42
Abb. 4-4: Schema der Isolierung und Anreicherung potentieller Leberzellvorläufer in der Nichtparenchymalen Zellfraktion (NPC).....	48
Abb. 4-5: Schematische Darstellung des Färbeprotokolls der Nichtparenchymalen Zellfraktion (NPC).....	50
Abb. 5-1: Viabilität und Zellzahl der erfolgreichen Hepatozytenisolierungen aus explantierten Lebern und Leberteilresektaten .....	66
Abb. 5-2: Hepatozytenkultur aus zwei explantierten Lebern und einem Leberteilresektat (LTRes) an den Tagen 1, 3 und 7 .....	70
Abb. 5-3: Enzymwerte und Stoffwechselprodukte im Mediumüberstand im Verlauf der Zellkultur.....	72
Abb. 5-4: Konzentration des umgesetzten Resorufins im Verlauf der Zellkultur .....	73
Abb. 5-5: Viabilität und Zellzahl der Hepatozyten im <i>Cold Storage</i> Versuch.....	75
Abb. 5-6: Viabilität der Hepatozyten vor und nach Kühlung.....	76
Abb. 5-7: LDH und Harnstoff der Zellkultur aus einer Zirrhose-Leber (ExplZirr_6) .....	77
Abb. 5-8: Oberflächenmarker der Zellfraktion EpCAM+/CD45– am Beispiel der explantierten Leber ExplPSC_7 .....	79
Abb. 5-9: Oberflächenmarker der Zellfraktion EpCAM–/CD45– am Beispiel der explantierten Leber ExplPSC_7 .....	80
Abb. 5-10: Relativer Anteil EpCAM-positiver Zellen an der Nichtparenchymalen Zellfraktion (NPC) von explantierten Lebern und Leberteilresektaten vor und nach der Anreicherung durch OptiPrep™ -Dichtegradientenzentrifugation .....	82
Abb. 5-11: Popularisierung der Mausleber durch humane Hepatozyten .....	86
Abb. 5-12: PCR-Ergebnisse der repopularisierten Mausleber der MCT-Gruppe.....	87
Abb. 5-13: Vergleich der Zellviabilität transplantierten Hepatozyten im erfolgreich und nicht erfolgreich repopularisierten Mausmodell.....	88

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 2-1: Übersicht ausgewählter Marker für Leberzellvorläufer (LcProg), Hepatozyten und Cholangiozyten .....	13
Tab. 4-1: Art und Anzahl der verwendeten Leberproben .....	40
Tab. 4-2: Für die Fluoreszenzfärbung der Nichtparenchymalen Zellfraktion verwendete Antikörper .....	49
Tab. 4-3: Gruppeneinteilung des Tiermodells .....	52
Tab. 4-4: Behandlungsschema der Mäuse über den gesamten Versuch.....	55
Tab. 4-5: Immunhistologie der Mausleber, Anti-Albumin-Färbung.....	57
Tab. 4-6: PCR-Profil für den Nachweis von humanem und murinem Albumin.....	59
Tab. 4-7: PCR-Profil für den Nachweis humanspezifischer Alu-Sequenzen.....	60
Tab. 4-8: Auflistung der verwendeten statistischen Tests .....	61
Tab. 4-9: An den Laborarbeiten beteiligte Personen und deren Funktion.....	63
Tab. 5-1: Ergebnisse der Hepatozytenisolierungen aus explantierten Lebern.....	67
Tab. 5-2: Ergebnisse der Hepatozytenisolierungen aus Leberteileresektaten (LTRes) ..	69
Tab. 5-3: Übersicht der Tiere im Versuch mit 15 Tagen Überlebenszeit .....	85

# 11 Anhang

## 11.1 Materialliste

### 11.1.1 Allgemein verwendete Materialien

<b>Geräte</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage AC 121 S	Sartorius, Göttingen
Babykostwärmer, BS19	Hartig & Helling GmbH & Co. KG, Bochum
BD FACSCalibur Cell Analyzer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CO2 Incubator MCO-18AIC	Sanyo Electric Co. Ltd., Osaka, Japan
Heating Pad HK5510	AEG, Nürnberg
Küchenwaage KS 49	beurer GmbH, Ulm
Lamin Air <sup>®</sup> HBB 2448 Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Berlin
MidiMACS <sup>™</sup> Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Operationsmikroskop Leica M651	Leica Microsystems, Wetzlar
Pipettierhelfer accu-jet <sup>®</sup> pro	VWR International GmbH, Darmstadt
Sanitas Infrarotlampe	Hans Dinslage GmbH, Uttenweiler
Schermaschine Aesculap <sup>®</sup> Favorita II	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Schlauchpumpe Cyclo II	Carl-Roth, Karlsruhe
Thermostatic Water Bath, WBS-14I	LabScientific, New York, USA
Wasserbad Typ 3044	Kötterman Labortechnik, Uetse-Hänigsen
Zentrifuge Heraeus <sup>™</sup> Fresco <sup>™</sup> 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus <sup>™</sup> Multifuge <sup>™</sup> 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
1 ml Syringe, Luer-Lock™-Tip	BD Medical, Franklin Lakes, USA
6 Well Zellkulturplatten, Falcon®	Corning Incorporated, Corning, USA
96 Well Platte, Half Area, schwarz	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Bottle Top Filter 500 ml, Sterilfilter, 0,45 µm, 75 mm	Nalgene™, Thermo Scientific, Waltham, USA
Cell Scraper 16 cm	Sarstedt Inc., Newton, USA
CryoPure Gefäß, 1,6 ml, weiß	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Disposable Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Histoacryl® Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Histosette® I, Einbettkassetten	VWR International GmbH, Darmstadt
Human Albumin ELISA Kit (Cell Culture Samples)	Assaypro, St. Charles, USA
Human Albumin ELISA Kit (Plasma, Serum Samples)	Assaypro, St. Charles, USA
Laborflaschen, rund, mit Schraubverschluss GL 45	VWR International GmbH, Darmstadt
LS Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Minisart® NML Syringe Filters, Sterilfilter, 0,2 µm	Sartorius AG, Göttingen
Mullkompressen 10x10 cm	Surgical Dressing & Co. Ltd., Shaoxing, China
Neubauer Improved Zählkammer	LO – Laboroptik Ltd., Lancing, England
Perfusor® Syringe 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipettenspitzen, 1000 µl/200 µl/10 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Ratiomed® Einweg-Pinzetten	Megro GmbH & Co. KG, Wesel
Serologische Pipetten, 25 ml/10 ml/5 ml, Falcon®	Corning Incorporated, Corning, USA
Serum-Monovette 1,2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Urinbecher steril	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml, Falcon®	Corning Incorporated, Corning, USA

<b>Chemikalien/Lösungen</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Aquatex®	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Avidin-/Biotin-Lösung	Endogenous Avidin/Biotin Blocking Kit, invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, USA
Bovine Serum Albumin, lyophilized powder	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Calciumchlorid-Dihydrat (Ca <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
ChillProtec®	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
ChillProtec® plus	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Citrate Buffer, pH 6.0, 10x Antigen Retriever	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Collagenase P	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Diaminobenzidin (DAB+, Liquid)	DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Easycoll®, Dichte 1,124 g/ml	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 70 % vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol ≥99,8 %, p.a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Formaldehydlösung 4 %, phosphatgepuffert	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fortecortin® Inject 4 mg	Merck Serono, Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Bovines Serumalbumin (FBS)	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES analytical grade	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
HEPES Pufferlösung, 1 M	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Humanalbumin 200 g/l, Infusionslösung	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Huminsulin® Normal 100	Lilly Deutschland GmbH, Gießen

<b>Chemikalien/Lösungen (fortgeführt)</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Hydrogen peroxide solution, 30 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kollagenlösung Typ I, vom Rattenschwanz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
L-Alanyl-L-Glutamin, 200 mM	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Monocrotaline (MCT)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Natriumacetat	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Natriumazid, reinst	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxidlösung (NaOH), 1 N	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumpyruvat, 100 mM	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
OptiPrep™ Density Gradient Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS, Phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbecco's PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin, flüssig	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Protease	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resazurin Sodium Salt	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Resorufin Sodium Salt	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Salzsäure (HCl), 1 N	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Streptavidin HRP, 0,85 g/l	DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
β-Glucuronidase/ Arylsulfatase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Triton-X 100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypan Blue Solution 0,4 %	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Twen 20	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Williams Medium E, ohne Phenolrot	Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt
Xylol (Xylene)	J.T. Baker Inc., Jackson, USA

<b>Antikörper</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
CD326 (EpCAM) MicroBeads, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD326 (EpCAM)-PE, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD45-FITC, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD90-APC, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
CD133/1 (AC133)-APC, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
APC Ms Anti-Human CD56	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
APC Ms Anti-Human CD54	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Ms IgG <sub>1</sub> Isotype Control-APC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Anti-Human Serum Albumin antibody (ab2406)	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Goat Anti-Rabbit IgG (HRP), (ab6721)	DAKO, Agilent Technologies, Santa Clara, USA

<b>Chirurgische Instrumente und Materialien für das Tiermodell</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Abdecktuch, 3-lagig	Surgical Dressing & Co. Ltd., Shaoxing, China
Assistent <sup>®</sup> Wattestäbchen	Reactolab SA, Servion, Schweiz
Briefklammern	Durable, Iserlohn
Charité OP Masken Standard	MOTEX Healthcare, Liège, Belgien
Charité Vlieskompressen	Surgical Dressing & Co. Ltd., Shaoxing, China
Chirurgische Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Durapore <sup>™</sup> 2,5 cm Klebeband	3M Deutschland GmbH, Neuss
Ethanol 70 % vergällt	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gammex <sup>®</sup> PF, sterile Handschuhe	Ansell Healthcare Europe N.V., Brüssel, Belgien
Gebogene mikrochirurgische Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Gelita-Tampon	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Irisschere	Aesculap AG, Tuttlingen
Microgefäßclip	Dumont, Brüssel, Belgien
Microlance <sup>™</sup> 3, 24G Kanüle	Becton Dickinson & Co. Ltd., Drogheda, Irland

<b>Chirurgische Instrumente und Materialien für das Tiermodell (fortgeführt)</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Microlance™ 3, 27G Kanüle	Becton Dickinson & Co. Ltd., Drogheda, Irland
Mikrochirurgische Schere	Aesculap AG, Tuttlingen
Mosquitoklemme gebogen	Aesculap AG, Tuttlingen
Nadelhalter, makro- und mikrochirurgisch	Aesculap AG, Tuttlingen
Omnifix-F 1 ml Einmalspritze	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
OP-Haube, grün	FarStar® medical GmbH, Barsbüttel
PDS*II 4-0 Ethicon	Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Prolene* 6-0	Johnson&Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Seide, nicht resorbierbar, geflochten, 7-0	Resorba® Medical GmbH, Nürnberg

<b>Medikamente</b>	
<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Antisedan® 5 mg/ml	Janssen-Cilag GmbH, Neuss
Baytril® – Das Original 2,5%	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Bepanthen® Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Domitor® 1 mg/ml	Elanco Animal Health, Bad Homburg
Forene® 100 % (V/V) Isofluran	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Ludwigshafen
Ketamin 10 %	WDT, Garbsen
Melosolute 5 mg/ml	CP Pharma, Burgdorf
NaCl 0,9 %, Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Novaminsulfon 500 mg Lichtenstein	Winthrop Arzneimittel GmbH, Frankfurt am Main

### 11.1.2 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen für die Zellisolierung

#### **Stammlösung I (für Perfusions- und Stopplösung)**

- 83 g NaCl (1,42°M)
- 5 g KCl (67 mM)
- 24 g HEPES analytical grade (100 mM)
- in 1000 ml Aqua dest. lösen
- pH 7,5 einstellen und steril filtrieren (Bottle Top Filter 500 ml)
- Aufbewahrung: 4 °C

#### **Perfusionslösung**

- 50 ml Stammlösung I
- 0,475 g EGTA (2,5 mM)
- 450 ml Aqua dest.
- 20 min bei 37°C mischen bis das EGTA vollständig gelöst ist
- pH 7,5 einstellen und steril filtrieren (Bottle Top Filter 500 ml)
- Aufbewahrung: 4 °C

#### **Stopplösung**

- 50 ml Stammlösung I
- 450 ml Aqua dest.
- steril filtrieren (Bottle Top Filter 500 ml)
- Aufbewahrung: 4 °C
- 25 ml Humanalbumin 200 g/l, Infusionslösung direkt vor Gebrauch zusetzen

#### **Stammlösung II (für Kollagenaselösung)**

##### Lösung A:

- 5,85 g NaCl (67 mM)
- 0,75 g KCl (6,7 mM)
- 36 g HEPES analytical grade (100 mM)
- 7,5 g Bovine Serum Albumin (0,5 %)
- in 1300 ml Aqua dest.
- pH 7,6 einstellen

##### Lösung B:

- 1,05 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O (4,8 mM)
- in 150 ml Aqua dest.

Anschließend:

- Lösung A und Lösung B mischen
- mit Aqua dest. auf Gesamtvolumen von 1500 ml auffüllen
- pH 7,6 einstellen und steril filtrieren (Bottle Top Filter 500 ml)
- Aufbewahrung: 4 °C

### **Kollagenaselösung**

- 100 mg Collagenase P (0,1 %)
- in 100 ml Stammlösung II
- direkt vor Gebrauch mischen und steril filtrieren (Minisart<sup>®</sup> NML Syringe Filters, 0,2 µm)

### **Enzymlösung Desoxyribonuklease/Protease für die LcProg-Isolierung**

- 2 mg DNase I (0,004 %)
- 10 mg Pronase E (0,1 %)
- in 10 ml PBS
- direkt vor Gebrauch mischen und steril filtrieren (Minisart<sup>®</sup> NML Syringe Filters, 0,2 µm)

### 11.1.3 Allgemein verwendete Puffer und Lösungen für die Analytik und das Tiermodell

#### **Modifiziertes William's Medium E (mod. Will E)**

- 500 ml William's Medium E, ohne Phenolrot
- 5 ml Penicillin/Streptomycin, flüssig
- 5 ml L-Alanyl-L-Glutamin, 200 mM
- 5 ml Natriumpyruvat, 100 mM
- 7,5 ml HEPES Pufferlösung, 1 M
- 60 µl Huminsulin<sup>®</sup> Normal 100
- 100 µl Fortecortin<sup>®</sup> Inject 4 mg
- 50 ml Fötales Bovines Serumalbumin (FBS)
- mischen und steril filtrieren (Top Filter 500 ml)
- Aufbewahrung: 4 °C

#### **Modifiziertes William's Medium E ohne FBS (mod. Will E ohne FBS)**

- siehe oben (mod.°Will°E), jedoch wird kein Fötales Bovines Serumalbumin (FBS) hinzugegeben
- Aufbewahrung: 4 °C

#### **MACS-Puffer**

- 2,5 g Bovine Serum Albumin (0,5 %)
- 300 mg Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 2 mM))
- in 500 ml PBS bei 37°C mischen bis das EDTA vollständig gelöst ist
- pH 7,5 einstellen und steril filtrieren (Bottle Top Filter 500 ml)
- Aufbewahrung: 4 °C

#### **FACS-Puffer**

- 10 ml Fötales Bovines Serumalbumin (2 %)
- 0,5 g Natriumazid (0,1 %)
- in 500 ml PBS mischen bis vollständig gelöst
- Aufbewahrung: 4 °C

#### **Resazurinlösung**

Resazurin-Stammlösung (4 mM):

- 0,5 g Resazurin Sodium Salt
- in 500 ml mod. Will E ohne FBS
- 20 min mischen bis vollständig gelöst und steril filtrieren (Bottle Top Filter 500 ml)

Resazurin-Arbeitslösung (0,4 mM):

- 5 ml Resazurin-Stammlösung
- in 45 ml mod. Will E ohne FBS
- Aufbewahrung: je bei 4 °C

### **Enzymlösung Arylsulfatase/ $\beta$ -Glucuronidase für den Resazurin-Assay**

Enzym-Stammlösung (bereits als eine gemischte Lösung erworben):

- $\beta$ -Glucuronidase 100.000 U/ml
- Arylsulfatase 800.000 U/ml

Enzym-Arbeitslösung:

- $\beta$ -Glucuronidase 600 U/ml
- Arylsulfatase 4800 U/ml
- in Natriumacetat-Puffer im Verhältnis 1:166 lösen

### **Natriumacetat-Puffer**

- 0,82 g Natriumacetat (0,1 M)
- in 100 ml Aqua dest.
- pH 4,5 einstellen
- Aufbewahrung: 4 °C

### **Resorufin-Standardlösung**

Resorufin-Stammlösung (1 M):

- 0,5 g Resorufin Sodium Salt
- in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Aufbewahrung: -20 °C

Resorufin-Arbeitslösung (1 mM):

- 12  $\mu$ l Resorufin-Stammlösung
- in 12 ml mod. Will E ohne FBS
- direkt vor Gebrauch mischen und Standard-Reihe ansetzen

### **Monocrotalinlösung**

- 100 mg Monocrotaline (2 %)
- in 5 ml NaCl 0,9 %, Isotonische Kochsalzlösung
- pH-Wert auf pH 2 absenken und 20 min mischen bis vollständig gelöst
- pH 7,5 einstellen und steril filtrieren (Minisart<sup>®</sup> NML Syringe Filters, 0,2  $\mu$ m)
- Aufbewahrung: 4 °C

## 11.2 Vorlage des *score sheets* für die postoperative Überwachung

### ScoreSheet für die tägliche klinische Beurteilung von Versuchstieren

#### Kategorieeinteilung:

Kategorie	Anweisungsanzahl	Maßnahme
<b>A</b>	2 oder mehr	Tier <u>mehrfach</u> täglich beobachten Bei anhaltenden Symptomen Projektleiter/ Tierarzt hinzuziehen
<b>B</b>	1 5 oder mehr (siehe C1)	Tierarzt hinzuziehen, Projektleiter informieren Tötung in Narkose
<b>C</b>	1	Sofortige Tötung in Narkose

Anweisung	Symptom
<b>A1</b>	Tier isoliert sich
<b>A2</b>	Struppiges, ungepflegtes Fell, Piloerektion
<b>A3</b>	Aufgetriebener Leib
<b>A4</b>	Geringfügig verstärkte Atmung
<b>A5</b>	Urin- oder Kotveränderung
<b>A6</b>	Anhaltende Obstipation
<b>A7</b>	Hautverletzungen oder -veränderungen
<b>A8</b>	Fehlstellung der Zähne
<b>A9</b>	Tier vermeidet Bewegungen
<b>A10</b>	Teilnahmslosigkeit
<b>A11</b>	Ruhelosigkeit
<b>A12</b>	Stereotypische Bewegungen im Kreis („circling“)
<b>A13</b>	Stelzgang
<b>B1</b>	Schmerz (gekrümmte Haltung)
<b>B2</b>	Leicht eingesunkene und leicht trübe Augen
<b>B3</b>	Blässe oder leichter Ikterus (z. B. Augen, Ohren, Haut)
<b>B4</b>	Blut an Körperöffnungen, blutiger Kot
<b>B5</b>	Deutlich verstärkte Atmung, Keuchen
<b>B6</b>	Durchfall (falls andauernd und schwächend)
<b>B7</b>	Kurzzeitige Krampfanfälle, Torkeln, vorübergehende Apathie
<b>B8</b>	Kopfschiefhaltung
<b>B9</b>	Parese(n)
<b>B10</b>	Postoperative Wundheilungsstörungen
<b>B11</b>	Lokale Infektion(en)
<b>B12</b>	Abzess(e)
<b>B13</b>	Bauch hart oder gespannt
<b>B14</b>	Hautfalten bleiben stehen, Dehydratation
<b>B15</b>	Ödembildung

<b>B16</b>	Automutilation (z. B. Annagen von Zehen)
<b>B17</b>	Ungewöhnliche Lautäußerungen beim Ergreifen
<b>B18</b>	Zähneknirschen
<b>B19</b>	Ungewöhnliche Gewichtszunahme
<b>B20</b>	>10 % Gewichtsdefizit zu nativem Tier gleichen Alters (Wachstumskurve!)

### **Scores für Abbruchkriterien während OP (PH, bzw. LcTx)**

<b>Score</b>	<b>Beobachtung</b>
<b>C1</b>	Operativ nicht beherrschbare Blutungen nach Gefäßruptur während Leberteilresektion (PH)
<b>C2</b>	Durchtrennung anatomisch wichtiger Strukturen (z. B. Gallengang, Dünn- oder Dickdarm, Pankreas, Oesophagus)
<b>C3</b>	Hoher Blutverlust
<b>C4</b>	Komplette Pfortaderthrombose

### **Score für Abbruchkriterien im Versuchsverlauf**

<b>Anweisung</b>	<b>Symptome</b>
<b>C5</b>	Kombination von B / B1 / B3 / B4 / B7
<b>C6</b>	Dunkle Verfärbung des Unterbauchs bzw. der Hodensäcke
<b>C7</b>	Rektumprolaps
<b>C8</b>	Paralysen (wenn keine eigenständige Nahrungs- und Wasseraufnahme mehr möglich ist)
<b>C9</b>	Moribund
<b>C10</b>	>20 % Gewichtsdefizit zu nativem Tier gleichen Alters (Wachstumskurve!)
<b>C11</b>	Erhöhte Apathie (laterale Seitenlage)
<b>C12</b>	Verstärkte Exsikkose (Dehydratation)
<b>C13</b>	Glanzlose, trübe Augen
<b>C14</b>	Ikterus (Gelbfärbung der Haut, dunkel verfärbter Urin)

### **11.3 Finanzierung des Projektes**

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung des beantragten Projektes „Neo-hybrides Lebertransplantat – der Einsatz autologer Hepatozyten und hepatischer Progenitorzellen zur Toleranzinduktion nach Lebertransplantation“ (Förderungsnummer: SA 2151/1-1).



---

## 12 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht:

### Vorträge:

Mogl M.T., Belaschk E., Mukiibi R., Rohn S., Schmidt T., Tang P., Neuhaus P. und Sauer I.M. (2013).

„Characterization of cells isolated from explanted diseased human livers and evolution after cold storage.“

16<sup>th</sup> ESOT Congress, Wien, Österreich, 8.-11. September 2013

### Poster:

Mogl M.T., Belaschk E., Mukiibi R., Rohn S., Schmidt T., Tang P. und Sauer I.M. (2013).

„Isolation of adult hepatocytes and progenitor cells from explanted diseased human livers and evolution after cold storage.“

12<sup>th</sup> Congress of the Cell Transplant Society, Mailand, Italien, 7.-11. Juli 2013

Mukiibi R., Belaschk E., Rohn S, Mogl M.T. und Sauer I.M. (2013).

„Isolation of Primary Human Hepatocytes from Diseased Livers after Explantation.“

24<sup>th</sup> European Students' Conference, Berlin, Deutschland, 4.-7. September 2013



## 13 Danksagung

Ich danke **Herrn Univ.-Prof. Dr. Achim D. Gruber, Ph.D.(Cornell Univ.)** aus dem Institut für Tierpathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin für die Übernahme der Arbeit und die unkomplizierte, sehr hilfreiche Betreuung.

Bei **Herrn Prof. Dr. med. Igor M. Sauer** bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese interdisziplinäre Arbeit mit der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, in der AG Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin durchführen zu dürfen.

Ein besonderer Dank geht an **Frau Dr. med. Martina Mogl** für die Vermittlung des Themas, die stets freundliche und ermutigende Beratung in allen Bereichen der Durchführung des Projektes sowie für die Durchsicht des Manuskriptes.

Ebenfalls ein besonders herzlicher Dank geht an **Frau Dipl.-Ing. Susanne Rohn** für die inhaltliche, moralische und tatkräftige Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit, die im Wesentlichen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Ich danke der AG Sauer für die freundliche Aufnahme in ihr Team und für die tatkräftige Unterstützung, allen voran **Ramla Mukiibi, Peter Tang** und **Tim Schmidt**, die sich ebenfalls zu den unmöglichsten Tages- und Nachtzeiten für das Projekt engagiert haben. Außerdem danke ich **Frau Dr. rer. medic. Anja Reutzel-Selke**, die mich vor allem in der Endphase maßgeblich unterstützt hat.

Nicht zuletzt danke ich meinem Arbeitgeber, der **Tierarztpraxis Dr. Claudia Pastor**, und meinen dortigen Kollegen **TÄ Katharina Venz** und **Dr. Jens-Erik Wolber** für die Geduld und Flexibilität bei den sich ergebenden Sonderwünschen der nebenher durchgeführten Promotion.

**Meinen lieben Eltern widme ich diese Arbeit** für die stets bedingungslose Liebe und Unterstützung in jeder Lebenslage.



## **14 Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, den 22.09.2016

Sascha Elisa Belaschk