

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

DISSERTATION

Isolation und Charakterisierung von primären humanen Leberzellen  
und deren Anwendung in *in vivo* nahen *in vitro* Lebermodellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Victoria Kegel

aus Aschersleben

Datum der Promotion: 10.03.2017

Meine Eltern

Dimidium facti, qui coepit, habet: sapere aude, incipe

Horaz

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG DER PUBLIKATIONSPROMOTION .....</b>	<b>1</b>
ABSTRACT ENGLISCH .....	1
ABSTRACT DEUTSCH .....	2
EINLEITUNG .....	3
<i>Wissenschaftliche Grundlagen .....</i>	<i>3</i>
<i>Zielstellung der kumulativen Promotion .....</i>	<i>4</i>
METHODIK .....	5
<i>Materialien .....</i>	<i>5</i>
<i>Isolation von PHH und NPC aus humanem Lebergewebe .....</i>	<i>5</i>
<i>Identifizierung und Charakterisierung von NPC .....</i>	<i>8</i>
<i>Bestimmung von Zell-Viabilität und Zell-Aktivität .....</i>	<i>9</i>
<i>Evaluation des Gesamtproteingehaltes.....</i>	<i>9</i>
<i>Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) .....</i>	<i>9</i>
<i>Messung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen.....</i>	<i>9</i>
<i>Kupffer Zell Stimulation .....</i>	<i>9</i>
ERGEBNISSE.....	10
<i>Isolation und Charakterisierung der einzelnen Leberzellpopulationen.....</i>	<i>10</i>
<i>Funktionelle Charakterisierung und Kultivierung der einzelnen NPC .....</i>	<i>11</i>
<i>Kupffer-Zell-Antwort nach Hepatozyten-Stress/-Schädigung.....</i>	<i>11</i>
DISKUSSION .....	12
LITERATURVERZEICHNIS.....	17
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>18</b>
ANTEILSERKLÄRUNG AN DEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN .....	19
<b>ORIGINALARBEITEN ALS PROMOTIONSLEISTUNG .....</b>	<b>21</b>
<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>62</b>
<b>KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE .....</b>	<b>68</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>69</b>

# Zusammenfassung der Publikationspromotion

## Abstract englisch

This thesis comprises three peer reviewed publications dealing with the isolation, and characterization of primary human parenchymal and non-parenchymal liver cells (NPC) and their application in *in vitro* liver models.

2 dimensional monocultures of primary human hepatocytes (PHH) are considered to be the gold standard for *in vitro* testing of hepatotoxicity. However, these models miss the presence of NPC. NPC consist of Kupffer cells (KC), liver endothelial cells (LEC), and hepatic stellate-cells (HSC) and play a central role in physiological and pathophysiological processes. Regarding drug-induced liver injury (DILI), NPC can modulate immunologic reactions leading to an augmented damage of the liver tissue but also to induction of immunologic tolerance. The development of innovative co-culture models could possibly help to understand the immunologic modulation of hepatotoxicity.

This thesis outlines the establishment of a method to isolate PHH and NPC from the same liver tissue specimen. The successful identification and characterization paved the way for the establishment of an *in vitro* liver model for the investigation of immunologic reactions caused by DILI.

PHH and NPC were isolated from human tissue samples using a two-step EDTA/collagenase perfusion technique. KC, LEC, and HSC were separated using specific adherence properties and magnetic activated cell sorting. The NPC were identified using specific antibodies and immunofluorescent microscopy. The quantifications revealed a yield of  $1.9 \times 10^6$  KC,  $2.7 \times 10^5$  LEC and  $4.7 \times 10^5$  HSC per gram liver tissue, showing viabilities >90% and purities >90%. Subsequently, the characterization of functional parameters during a culture time of 5 days showed that KC dispose a limited life span, LEC consist of a heterogeneous population and HSC tend to transdifferentiate in myofibroblasts. For the simulation of DILI, KC were stimulated with supernatants from drug treated PHH. KC activation was investigated by the measurement of reactive oxygen species (ROS, DCF-assay) and cell activity (XTT-assay) and the immunologic reactions by analysis of cytokine production (ELISA). In KC an increase of cell activity as well as a donor specific ROS-formation was observable. Additionally, donor and drug dependent releases of pro- and anti-inflammatory cytokines were detected.

The isolation protocol described, enables the isolation of PHH and NPC in high quality and quantity from one piece of liver tissue. The characterization showed that KC were the most suitable cell type for usage in *in vitro* models. The detection of donor- as well as drug specific immunologic reactions makes the established model to a promising tool for the investigation of DILI.

## Abstrakt deutsch

Diese Publikationspromotion umfasst drei in internationalen Fachzeitschriften publizierte Artikel, die sich mit der Isolation und Charakterisierung von primären humanen parenchymalen und nicht-parenchymalen Leberzellen (NPC) sowie deren Anwendung in *in vitro* Lebermodellen beschäftigen.

Die klassische 2-dimensionale (2D) Kultur primärer humaner Hepatozyten (PHH) bildet den Goldstandard für die Untersuchung der *in vitro* Hepatotoxizität. Allerdings fehlt in diesen Kulturen die Anwesenheit NPC. Die NPC, zu denen Kupffer Zellen (KC), Leberendothelzellen (LEC) und hepatischen Stellat-Zellen (HSC) zählen, spielen eine zentrale Rolle bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Im Rahmen der Medikamenten-induzierten Leberschädigung (engl. Drug induced liver injury - DILI) kann es durch immunmodulierende Reaktionen von NPC sowohl zu einer vermehrten Schädigung des Lebergewebes, aber auch zur Induktion von immunologischer Toleranz kommen. Durch die Entwicklung innovativer Kokulturmodelle könnte die möglicherweise die immunologische Modulation von Hepatotoxizität erfasst werden.

Im Rahmen dieser Publikationspromotion wurde eine Methode etabliert, um PHH und NPC aus demselben Lebergewebe zu isolieren. Nach erfolgreicher Identifizierung und Charakterisierung bildeten diese die Grundlage für die Etablierung eines *in vitro* Lebermodells zur Untersuchung immunologischer Reaktionen im Rahmen von DILI.

PHH und NPC wurden mit Hilfe einer zweistufigen EDTA/Kollagenase-Perfusionstechnik aus einem Stück humanem Lebergewebe isoliert. Die in der NPC-Fraktion enthaltenen KC, LEC und HSC wurden mittels Adhärenz-Trennung und magnetischer Zellsortierung voneinander getrennt. Nach Identifikation der NPC mittels spezifischer Antikörper und immunfluoreszenz Mikroskopie konnten Ausbeuten von  $1,9 \times 10^6$  KC,  $2,7 \times 10^5$  LEC und  $4,7 \times 10^5$  HSC pro g Lebergewebe mit Viabilitäten  $> 90\%$  und Reinheiten  $> 90\%$  verzeichnet werden. Die anschließende Charakterisierung funktioneller Parameter in Kultur über 5 Tage zeigte, dass KC über eine limitierte Lebenszeit verfügen, LEC sich aus einer heterogenen Mischpopulation zusammensetzen und HSC zur Transdifferenzierung in Myofibroblasten neigen. Um DILI zu simulieren wurden KC mit den Überständen von substanzbehandelten PHH stimuliert. Die KC Aktivierung wurde durch Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, DCF-Assay) und der Zellaktivität (XTT-Test) sowie deren immunologische Reaktion mit Hilfe von verschiedenen Zytokin-ELISA evaluiert. In den KC konnte sowohl ein Anstieg der Zellaktivität, als auch eine donor-spezifische ROS-Bildung beobachtet werden. Zusätzlich zeigte sich eine donor- und medikamentenabhängige Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen.

Das beschriebene Isolationsprotokoll ermöglicht eine simultane Isolation von PHH und NPC in guter Qualität und Quantität aus einem Stück Lebergewebe. Die Charakterisierung zeigte, dass sich KC am besten für den Einsatz in einem Lebermodell eignen. Die Detektion sowohl donor- als auch medikamentenspezifischer immunologischer Reaktionen macht das etablierte Modell zu einem vielversprechenden Ansatz für die Untersuchung der Medikamenten induzierten Hepatotoxizität.

## Einleitung

### *Wissenschaftliche Grundlagen*

Die Leber spielt eine zentrale Rolle im Fremdstoffmetabolismus und somit auch bei der Genese medikamenteninduzierter Leberschädigung (engl. drug induced liver injury kurz DILI). Obwohl circa 20% aller neu zugelassenen Medikamente auf Grund von DILI wieder vom Markt genommen werden, bestehen nur rudimentäre Kenntnisse über den pathophysiologischen Mechanismus, die Inzidenz und die Prävalenz<sup>1,2</sup>. Zur Entstehung von DILI existieren zwei verschiedene Hypothesen, welchen immunologische Mechanismen zugrunde liegen. Es wird die intrinsische Hypothese von der idiosynkratischen unterschieden. Im Rahmen des intrinsischen DILI kommt es stereotyp und dosisabhängig zu einer Hepatotoxizität. Der dadurch induzierte Zellstress bzw. die induzierte Zellschädigung wird immunologisch detektiert und kann weitere Immunreaktionen verstärken. Die idiosynkratischen DILI-Reaktion ist unvorhersehbar und nicht dosisabhängig. Es wird vermutet, dass elektrophile Metabolite in die Zellen gebildet werden und mit nukleophilen Gruppen von Proteinen oder der DNA reagieren können. Die neu entstehenden Botenstoffe, zum Beispiel nach Reaktion mit Proteinen, Haptene genannt, können von Immunzellen detektiert werden. Die Immunzellen können unvorhersehbare idiosynkratische Immunreaktionen von Inflammation bis hin zur Sensitivierung triggern<sup>1,2</sup>.

Aktuell gelten Hepatozyten-Monokulturen als Goldstandard für Untersuchungen im Bereich des Medikamentenmetabolismus und der Hepatotoxizität. Die *in vivo* ablaufenden und für DILI grundlegenden immunologischen Reaktionen können in solchen *in vitro* Modellen nicht detektiert werden. In den aktuellen Studien zu DILI und den zugrunde liegenden Mechanismen werden vor allem das Fehlen der 3-dimensionalen Leberarchitektur und der nicht-parenchymalen Leberzellen (NPC) diskutiert<sup>3</sup>. Um die verschiedenen metabolischen und immunologischen Reaktionen im Rahmen von DILI besser abzubilden, sind Untersuchungen zur intrahepatischen Zell-Zell-Interaktionen nötig.

Intrahepatisch unterscheidet man die parenchymalen Hepatozyten und Cholangiozyten, von den NPC. Die Hepatozyten bilden die Grundlagen für die meisten Leberfunktionen, wie zum Beispiel die Gallensäureproduktion, den Fremdstoffmetabolismus und die Energiehomöostase<sup>4</sup>. Kupfer Zellen (KC), Hepatische Stellat Zellen (HSC) und Leberendothelzellen (LEC) bilden den Großteil der NPC-Fraktion der Leber.

KC sind intrasinusidal sitzende leberspezifische Makrophagen, die sowohl eine Schutzmechanismus gegen Endo-Toxine und exogene Partikel bilden, als auch intrahepatische Gewebeschäden detektieren. Chronische Exposition mit meist aus dem Gastrointestinaltrakt angeschwemmten Lipopolysaccharid (LPS) oder endogenen Proteinen, welche zum Beispiel vermehrt von nekrotischen Zellen sezerniert werden, führen zur KC-Aktivierung. Aktivierte KC produzieren im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen vermehrt reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). ROS können einmal selbst zytotoxisch auf zum Beispiel eingedrungene Organismen wirken. Zusätzlich kann durch ROS der NFκB-Signalweg aktiviert werden, welche elementar für eine Immunantwort ist. Die beschriebenen Stimuli, wie beispielsweise LPS, können durch spezifische Rezeptoren, wie zum Beispiel engl. toll-like receptors (TLR), auf der KC-Zelloberfläche detektiert werden. Zusätzlich können Zellen, Zellreste oder freigesetzte Proteine mittels Phagozytose aufgenommen werden. Die funktionelle Plastizität ist signalabhängig, sodass aktivierte KC die Möglichkeit besitzen, ihren Phänotyp entweder in M1- oder M2-Makrophagen zu variieren. In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass das M1-KC zu M2-KC Verhältnis eine zentrale Rolle in der Entstehung von inflammatorischen Prozessen in der Leber spielt<sup>5</sup>.

M1-KC sind involviert in inflammatorische Prozesse, wie akute Infektionen, aber auch bei der Initiierung von DILI oder der Fettleber-Erkrankungen<sup>5</sup>. Die Hauptstimuli sind neben LPS und Interferon-γ auch Tumor Nekrose Faktor-α (TNF-α), Interleukin 18 (IL-18) und IL-12. KC, welche den M1-Phänotyp angenommen haben, sezernieren typischer Weise TNF-α, IL-6 und IL-1<sup>5</sup>.

Im Gegensatz dazu schützen M2-KC die Leber gegen eine Exazerbation von inflammatorischen Reaktionen. Außerdem spielen sie eine zentrale Rolle in immunmodulatorischen Prozessen, wie Allergien,

Abwehr gegen Parasiten und Gewebsumbau. Typische Stimuli für M2-KC sind Immunglobulin-G-Fragmente aber auch IL-4 und IL-10. Die alternativen M2-KC produzieren Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-10 und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)<sup>5</sup>.

LEC, welche die Innenseite der Blutgefäße in der Leber auskleiden, haben abhängig von ihrer Lokalisation und Art des Gefäßes (Arterie, Vene und Pfortader) verschiedene funktionelle Eigenschaften. Die in dem Lebersinus liegenden LEC, welche zum Beispiel durch eine typische Fensterung charakterisiert sind, bilden die Barriere zwischen primären humanen Hepatozyten (PHH) und dem portal-venösem Blut. LEC regulieren den Austausch von gelösten Partikel. Neben der Fensterung ist einer der zentralen Austauschmechanismen die Rezeptor-vermittelten Pinozytose von gelösten Partikeln. Zusätzlich gehören die LEC neben den KC als Teil des Retikulohistiozytären-Systems zur Abwehr der Leber<sup>6,7</sup>.

Die aus dem Mesenchym stammenden HSC sind im perisinusidalem Raum der Leber lokalisiert. Die für HSC charakteristischen Lipidtröpfchen entstehen auf Grund der Speicherung von Retinol und anderen fettlöslichen Molekülen<sup>8</sup>. Im Rahmen von pathophysiologischen Veränderungen in der Leber können die HSC, zum Beispiel durch TGF- $\beta$ , aktiviert werden. Die aktivierten HSC differenzieren zu Myofibroblasten und können Proteine der extrazellulären Matrix bilden. Auf Grund dieser Eigenschaften nehmen sie eine zentrale Rolle in der Entstehung und Unterhaltung von Fibrose- und Zirrhose-Prozessen ein. Nach Aktivierung verlieren die HSC die Fähigkeit Retinol zu speichern<sup>8,9</sup>.

In einigen aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass auch die verschiedenen NPC eine zentrale Rolle in physiologischen, aber auch pathophysiologischen Leberprozessen, wie DILI, spielen<sup>3</sup>.

Zur Erstellung standardisierter humaner *in vitro* Ko-Kulturmodelle ist es elementar, die einzelnen Leberzelltypen aus humanem Lebergewebe mit hoher Viabilität und Reinheit zu isolieren. Erste simultane Isolationsversuche wurden bereits an nicht humanem Gewebe durchgeführt. Es wurden jedoch unseres Wissens nach noch nicht zuvor alle humanen NPC simultan neben den PHH isoliert und anschließend ausreichend charakterisiert<sup>6,8,10</sup>.

### *Zielstellung der kumulativen Promotion*

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der Lösung von 3 fundamentalen Problemen im Bereich der humanen *in vitro* Lebermodelle.

Aktuell ist es nicht möglich alle Leberzelltypen aus einem gemeinsamen Stück Lebergewebe simultan zu isolieren. Dies bildet jedoch die Grundlage für die Entwicklung möglichst *in vivo* ähnlicher Lebermodelle. Der bisherige Goldstandard für *in vitro* Lebermodelle ist die Hepatozyten-Monokultur. Auf Grund der vielfältigen Eigenschaften der NPC nehmen diese auch an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen in der Leber teil. Gerade im Zusammenhang mit DILI nehmen die NPC, insbesondere die KC, eine zentrale Rolle ein.

Um Lebermodelle mit parenchymalen Zellen und NPC zu etablieren, sind die Isolation der einzelnen Leberzelltypen und ihre Charakterisierung sowie Untersuchungen zum Verhalten der einzelnen Zelltypen in Kultur grundlegend.

Ist es möglich erfolgreich immunkompatible NPC und PHH aus demselben Lebergewebe zu isolieren, sollte mit der Etablierung eines *in vitro* Lebermodells zur Abbildung von DILI Prozessen begonnen werden. Dieser thematische Abschnitt ist von besonderem Interesse, da die Pathogenese von DILI noch nicht genau bekannt ist.

Auf Grund der unspezifischen Symptome gehört DILI zu den Diagnosen, die nur durch konsequentes Ausschließen aller anderen Krankheitsursachen gestellt werden kann. DILI bildet folglich die negative Schnittmenge aller möglichen Diagnosen. Auf Grund dessen, dass es keine zielgerichtete Untersuchungen gibt, ist die Dunkelziffer an mit DILI erkrankten Patienten hoch<sup>1</sup>. Die Medikamente, welche für solche Reaktionen ursächlich sind, sind aktuell noch nicht genau bekannt. Um die Pathogenese und die immunologische Rolle von DILI besser abzubilden und die Wirkung der verschiedenen Medikamente vorhersagen zu können, sind *in vitro* Lebermodelle, welche die *in vivo* Leberarchitektur möglichst genau wiedergeben und die Reaktion innerhalb der Zell-Zell-Interaktion abbilden, nötig.

Um die beschriebenen Probleme erfolgreich zu lösen, wurden drei große Hauptziele für diese Promotion formuliert:

- 1) Etablierung eines vereinfachten Protokolls zur parallelen Isolation von PHH, KC, LEC und HSC aus demselben Lebergewebe in hoher Viabilität und Reinheit.
- 2) Identifikation, Charakterisierung, Kultivierung der einzelnen Leberzelltypen, sowie Untersuchungen zu den Kulturbedingungen der einzelnen Leberzelltypen und deren Verhalten in Langzeitkultur.
- 3) Etablierung eines humanen KC-PHH-Modells zur Untersuchung von pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen im Rahmen von DILI.

## Methodik

### *Materialien*

Williams Medium E mit GlutaMAX™ und die Zusätze fetales Kälberserum (FCS), Penicillin/Streptomycin, Hepes, engl. Minimum Essential Medium Non-essential Amino Acids (MEM NEAA), Pyruvat, L-Glutamin und engl. Phosphate buffered saline (PBS) wurden bei Gibco erworben. Engl. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-Medium und engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) wurde von GE Healthcare bezogen. Dexametason wurde bei Merck und das Humaninsulin bei Sanofi Aventis gekauft. Percoll, Trypan Blau und HBSS wurden von Biochrome erworben. Alle weiteren genutzten Chemikalien, wenn nicht genauer beschrieben, wurden von Sigma bezogen.

Das Rattenschwanzkollagen wurde nach dem Protokoll von Rajan und Kollegen hergestellt<sup>11</sup>. PHH-Kultur-Medium hatte als Grundlage William's Medium E mit GlutaMAX™, welchem 10% FCS, 32 mU/ml Insulin, 15 mM HEPES, 0,1 mM MEM NEAA (100x), 1 mM Pyruvat und 1 mg/l Fortecortin zugesetzt wurden. KC-Aussaat-Medium besteht aus RPMI-Medium mit 1% L-Glutamin. KC-Kultur-Medium beinhaltet RPMI-Medium und 10% FCS, 1% L-Glutamin und 6,3 mM N-Acetyl-L-Cystein. LEC/HSC-Kultur-Medium besteht aus DMEM-Medium, welchem 10% FCS und 1% L-Glutamin zugesetzt wurde. Alle Medien wurden mit 100 U/100 µM Penicillin/Streptomycin versetzt.

Die Kultivierung der einzelnen Zelltypen erfolgte bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in einem befeuchteten Inkubator. Die Zellzählungen wurden einheitlich in einer Neubauer Zählkammer nach Trypanblau-Färbung durchgeführt.

### *Ausbeute (gezählte Zellen)*

$$= \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen der Zellsuspension (ml)} \\ \times 10\,000$$

### *Isolation von PHH und NPC aus humanem Lebergewebe*

Das verwendete humane Lebergewebe wurde in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie am Campus Virchow Klinikum der Charité-Universitätsmedizin Berlin, gemäß den Bestimmungen der Ethikkommission der Charité - Universitätsmedizin Berlin und nach Aufklärung und Einverständnis des Patienten, akquiriert.

Eine 2-Schritt-EDTA/Kollagenase - Perfusionstechnik wurde zur Isolation von PHH und NPC aus gesundem Lebergewebe von Patienten mit primären oder sekundären Lebertumoren genutzt (Figur 1A). Um die in der gewonnenen Suspension enthaltenen PHH von den NPC zu trennen, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 50 x g, 4°C für 5 min (Figur 1B). Die im Pellet enthaltenen PHH wurden entweder



direkt oder nach Aufreinigung mittels 25%-Perkoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (1250 x g, 4°C, 20 min, ohne Bremse) in PHH-Kultur-Medium aufgenommen (Figur 1C/D). Der Aufreinigungsschritt erfolgte nur, wenn die Viabilität der PHH nach dem Verdauungsprozess unter 70% lag. Die PHH wurden mit einer Dichte von  $14,5 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Zellkulturplatten ausgestreut.

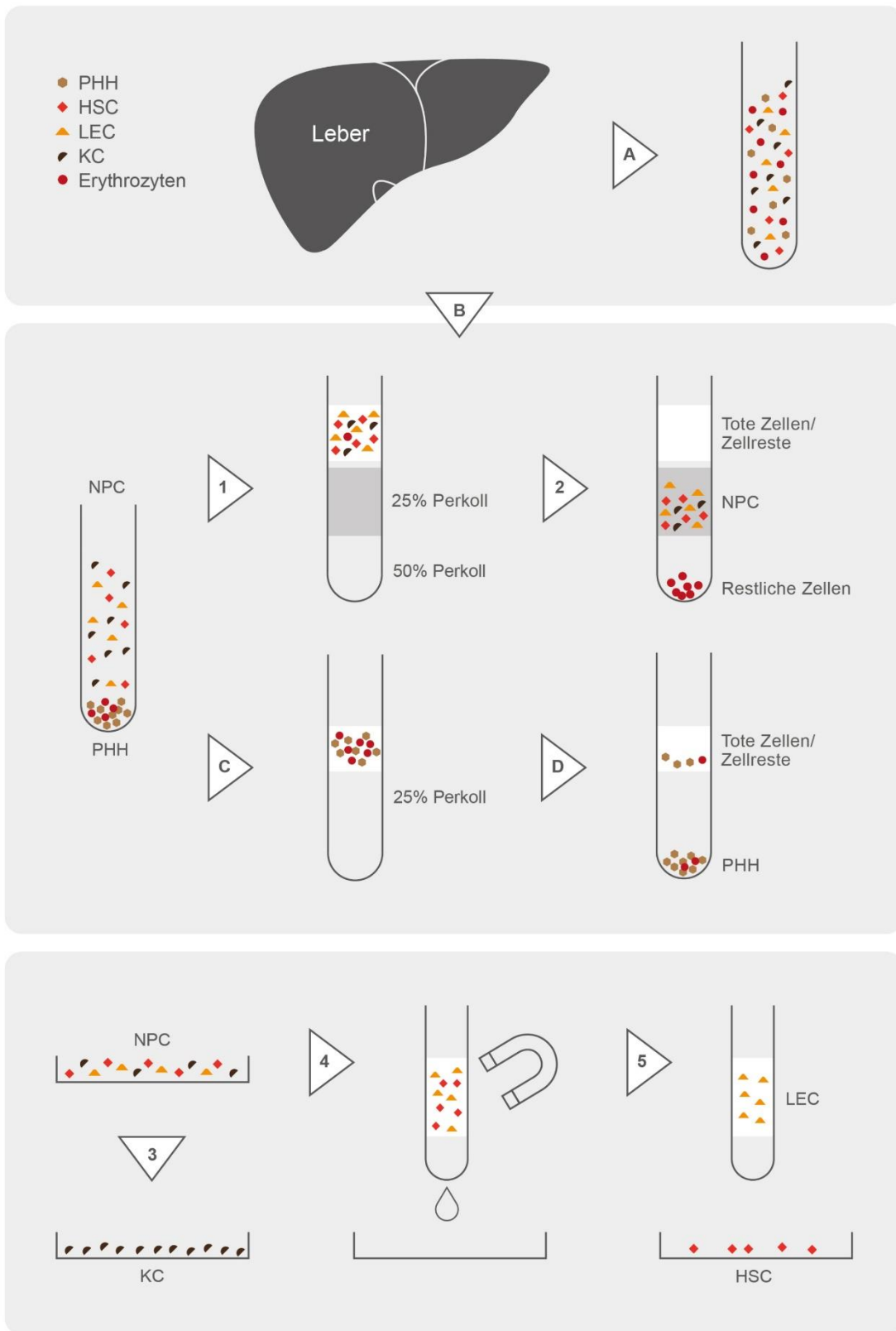
Die im Überstand enthaltenen NPC wurden mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation, Adhärenz-Trennung und Magnetischer Zellsortierung (MACS®) in ihre Populationen aufgetrennt. Zuerst wurden enthaltene Erythrozyten mittels Zentrifugation bei 72 x g, 4°C für 5 min eliminiert. Zur Sedimentation aller NPC folgen 2 Zentrifugationsschritte: 1) 300 x g, 4°C, 5 min und 2) 650 x g, 4°C, 7 min. Zur Aufreinigung der NPC-Fractionen erfolgte eine 50%/25%-Perkoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation. Auf den zweiphasigen Perkoll wurde sehr vorsichtig die Zellsuspension pipettiert. Im Anschluss wurden die präparierten Perkoll-Röhrchen bei 1800 x g, 4°C für 20 min, ohne Bremse zentrifugiert (Figur 1.1). Oberhalb der 25%igen Perkoll-Schicht sind nach der Zentrifugation verbliebende PHH, Zellreste und tot Zellen zu finden. Dies Schicht wird verworfen (Figur 1.2). Im Anschluss daran wurden die aufgereinigten NPC, die sich in der Schicht zwischen dem 50%-Perkoll und dem 25%-Perkoll befanden, gesammelt und mit HBSS gewaschen.

Anschließend wurden die NPC in KC-Aussaat-Medium aufgenommen und mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  Kupffer Zellen/cm<sup>2</sup> ausgestreut. Nach einer Adhärenzphase von 20 min auf Zellkulturplastikplatten adhärten nur die KC (Figur 1.3). Im Überstand befinden sich die verbliebenen LEC und HSC (Figur 1.4). Die adhärten KC wurden mit HBSS gewaschen und in KC-Kultur-Medium kultiviert.

Um die im Überstand enthaltenen LEC von den HSC zu trennen, wurde eine magnetische Zellsortierung genutzt. Um alle enthaltenen NPC zu sedimentieren, wurde der Überstand bei 300 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet entsprechend der Anleitung des MACS® (Miltenyi Biotech) aufgearbeitet. Es erfolgte eine immunzytochemische Markierung der LEC mit magnetischen CD31 Antikörpern. Im Anschluss daran wurden die markierten Zellen mittels eines Magneten abgetrennt.

Die CD31 negativen HSC, welche die MACS®-Säule einfach passieren konnten, wurden aufgefangen (Figur 1.5). Die HSC wurden in HSC/LEC-Kultur-Medium aufgenommen und mit einer Dichte von  $5 \times 10^4$  HSC/cm<sup>2</sup> auf mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Zellkulturplatten ausgestreut.

Der Magnet wurde von den übrigen LEC entfernt. Abschließend wurden die LEC aus der Säule herausgespült (Figur 1.5). Zum Schluss wurden die LEC in HSC/LEC-Kultur-Medium aufgenommen und mit einer Dichte von  $1,25 \times 10^5$  LEC/cm<sup>2</sup> auf mit Rattenschwanzkollagen beschichtete Zellkulturplatten ausgestreut.



Figur 1. Übersicht der Isolation von PHH und NPC.

Alle Leberzellen werden mittels einer 2-Schritt-EDTA/Kollagenase-Perfusionstechnik von der extrazellulären Matrix des Gewebes getrennt (A). Es folgt ein initialer Zentrifugationsschritt bei 50 x g, 4°C für 5 min um die PHH von den

NPC zu trennen (B). Die isolierten PHH wurden mittels eines 25%igen-Perkoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugationsschrittes (1250 x g, 4°C, 20 min, ohne Bremse) aufgereinigt (C/D).

Um die NPC von weiteren Zellen, toten Zellen und Zellresten zu trennen, folgte eine 25%/50%-Perkoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation bei 1800 x g, 4°C für 20 min ohne Bremse (1/2). Im Anschluss an die Zentrifugation (2) wurden die NPC, welche sich auf der 50%igen Perkoll-Schicht befanden, aufgesammelt und weiter aufgereinigt. Um die KC von den restlichen NPC zu trennen, wurde eine 20 minütige Adhärenzphase durchgeführt (3). Nur KC besitzen die Eigenschaft in kurzer Zeit auf Plastik zu adhären. So können die KC von den LEC und HSC getrennt werden (4). Die LEC wurden mit Hilfe des magnetischen Zellsortierungssystems (MACS®) von den HSC getrennt (5). Alle CD31 positiven Zellen wurden mit magnetischen Antikörpern markiert. Die CD31 positiven LEC wurden durch den Magneten in der Säule gehalten, während die CD31 negativen HSC den Magneten passieren können (5). Abschließend können die LEC nach Entfernung des Magneten aus der Säule gespült werden (5).

### Identifizierung und Charakterisierung von NPC

Zur Identifizierung der einzelnen NPC-Typen wurden die isolierten Zellen mittels spezifischen fluoreszierenden Antikörpern markiert und anschließend mikroskopisch untersucht. Hierfür wurden die Zellkulturen mit PBS gewaschen und anschließend mit 4% Formaldehyd (Herbeta) für 10 min fixiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mittels 0,5% Triton X-100 für 2 min permeabilisiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Nachdem die unspezifischen Bindungen mit 1% bovinem Serumalbumin für eine Stunde geblockt wurden, erfolgte die Inkubation mit den primären zellspezifischen Antikörpern (Tabelle 1) für 60 min. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit dem sekundären Antikörpern Alexa Fluor® 488 (Ziege Anti-Maus IgG) oder Alexa Fluor® 594 (Ziege Anti-Hase IgG) (Santa Cruz Biotechnology) für 60 min inkubiert. Kurz vor Ende der Inkubationszeit mit den sekundären Antikörper wurden die Zellkerne zusätzlich mit Hoechst 33342 für 15 min inkubiert. Für die Untersuchung und Analyse der Zellen wurden die Färbungen mit Hilfe von Immunfluoreszenzbildern dokumentiert.

Tabelle 1: Primäre Antikörper zur Immunfluoreszenzfärbung der isolierten PHH und NPC

Antikörper	Typ	Spezies	Reaktivität	Hersteller	Marker
CD 68	Monoklonal	Maus	human	R&D Systems	KC
CK 18	Monoklonal	Maus	human	Santa Cruz	PHH
CK 19	Polyklonal	Hase	human	Santa Cruz	Cholangiozyten
GFAP	Monoklonal	Maus	human	Sigma	HSC
Vimentin	Monoklonal	Maus	human	Santa Cruz	HSC LEC

Zur genaueren funktionellen Charakterisierung der isolierten Zellen wurden verschiedene Assay zum Nachweis von Phagozytose und Pinozytose, sowie der Retinolspeicherung genutzt.

Eine der KC-spezifischen Eigenschaften ist die Phagozytose von Zellen oder Zellreste. Zur Untersuchung der Phagozytose wurde  $1 \times 10^6$  KC für 24 Stunden mit  $4 \times 10^6$  FITC gekoppelten Latex Beads (Fluoresbrite™ Plain YG 3.0 Microspheres, Polyscience Inc.) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 4% Formaldehyd fixiert und mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Für LEC ist die Pinozytose von acetylierten Lipoproteinen niedriger Dichte (Low Density Lipoprotein, LDL) charakteristisch. Die isolierten LEC wurden mit 10 µg/ml an 3,3-dioctadecyloxycarbocyanin Perchlorat gekoppeltem acetyliertem LDL (Tebu-Bio) für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit Hoechst 33342 gefärbt. Die Dokumentation der Ergebnisse dieser Charakterisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Typisch für HSC ist die Einlagerung von blau-grün autofluoreszierendem Retinol. Nach Anregung mit einer Wellenlänge von 328 nm können die gespeicherten Retinoltröpfchen fluorezenzmikroskopisch detektiert werden.

#### *Bestimmung von Zell-Viabilität und Zell-Aktivität*

Zur Evaluierung der Zell-Viabilität oder Zell-Aktivität wurde der XTT-Assay (Roche Diagnostics GmbH) genutzt. Das gelbfarbene Tetrazoliumsalz XTT wird abhängig von der Verfügbarkeit intrazellulärer Redoxäquivalente und abhängig von der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen zu dem orangefarbenen Formazan reduziert. Der Test wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die plattenphotometrisch gemessene Umsetzung des Farbstoffes korreliert mit der Zellviabilität und der Zellaktivität.

#### *Evaluation des Gesamtproteingehaltes*

Der Gesamtproteingehalt wurde mit dem Sulforhodamine B (SRB-Assay), welcher sowohl intra-, als auch extrazellulär Proteine erfasst, bestimmt. Die kultivierten Zellen wurden mit 4% Formaldehyd fixiert und anschließenden zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die fixierten Zellen für 30 Minuten mit 0,4% SRB-Lösung im Dunkeln und bei Raumtemperatur kultiviert. Nachdem die Zellen mit 1% Essigsäure gewaschen wurden, folgte die Inkubation mit 10 mM TRIS-Lösung für 10 Minuten. Die Detektion der Absorption erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 565 nm.

#### *Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)*

ROS, ein zentraler Signalstoff bei inflammatorischen Prozessen und in den KC, wurde zur Evaluation der KC-Aktivierung genutzt. Die intrazelluläre ROS-Bildung wurde mit Hilfe des DCF-Assay detektiert. Die Ausgangssubstanz ist das permeable Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (DCF-DA), welches intrazellulär zuerst durch zelluläre Esterasen deacetyliert und im Anschluss bei Anwesenheit von ROS oxidiert wird. Es entsteht dabei fluoreszierendes Dichlorodihydrofluorescein (DCF). Zur Bestimmung der ROS wurden die KC in phenolrot-freiem Medium mit 20  $\mu$ M DCF-DA (Santa Cruz) für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die KC mit neuem phenolrot-freiem Medium für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm und einer Emission von 520 nm wurde photometrisch detektiert.

#### *Messung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen*

Um die Reaktion der KC zu untersuchen wurde die Ausschüttung von spezifischen pro-inflammatorischen (TNF- $\alpha$ , IL-6) und anti-inflammatorischen (IL-10, PGE<sub>2</sub>) Zytokinen untersucht. Zur Bestimmung der verschiedenen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 (PrepoTech GmbH) und PGE<sub>2</sub> (Thermo Fischer Scientific) wurden ELISA genutzt. Bei der Durchführung wurde nach der Anleitung des entsprechenden Herstellers gehandelt.

#### *Kupffer Zell Stimulation*

Um die Aktivierung und Reaktion von KC im Rahmen von DILI-Prozessen abzubilden, wurden KC mit dem Überstand von mit Medikamenten behandelten PHH inkubiert. Es wurden die bereits sehr gut untersuchten nicht-steroidalen Entzündungshemmer Acetaminophen (APAP) und Diclofenac (DIC) für die Hepatozyten-Stimulation genutzt. Nach einer 4 stündigen Equilibrierungsphase mit KC-Aussaat-Medium wurden die PHH entweder mit 100  $\mu$ M APAP oder mit 100  $\mu$ M DIC für 1 Stunde behandelt. Der PHH-Überstand wurde

dann auf die KC überführt. Nach einer zweistündigen Inkubationsphase wurden die KC-Aktivierung und die KC-Reaktion untersucht. Zur Evaluation der KC-Aktivierung wurden die Zell-Aktivität (XTT-Assay) und die intrazelluläre ROS-Bildung (DCF-Assay) genutzt. Zusätzlich konnte die KC-Reaktion durch Detektion typischer pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen evaluiert werden. Hierfür wurden die Überstände bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend mit den entsprechenden ELISA auf die ausgeschütteten Zytokine untersucht.

## Ergebnisse

### *Isolation und Charakterisierung der einzelnen Leberzellpopulationen*

PHH und NPC wurden parallel aus einem Stück humanem Lebergewebe isoliert. Es wurde großen Wert auf eine optimale Ausbeute und gute Zellviabilität gelegt. Um diese Ziele umzusetzen wurde beispielsweise im Verdauungsschritt die Aktivität von Proteasen, welche in der nicht 100% reinen Kollagenase enthalten sind, durch die Supplementation von FCS vermindert. Außerdem wurde die Mikroperfusion durch Abklemmen einzelner Knopfkanülen oder leichtem Druck mit einem Spatel auf das Stück Lebergewebe optimiert. Es konnten erfolgreich neben den PHH auch die KC, LEC und HSC isoliert werden.

Es wurden  $14,2 \times 10^6 \pm 6,6 \times 10^6$  viable PHH/g Lebergewebe mit einer durchschnittlichen Viabilität von  $76,6 \pm 4,2\%$  isoliert. Mikroskopisch waren die isolierten Hepatozyten im Durchmesser zwischen 20 und 30  $\mu\text{m}$  groß und zeichneten sich durch ein großes Zellplasmavolumen und intrazellulär gelegene Lipidtröpfchen aus. Auffällig war außerdem die von Zelle zu Zelle variierende Anzahl an Zellkernen. Nach einer Adhärenz Phase von circa 12 Stunden zeigte sich eine kubische Zellform. Zur Identifizierung wurden die isolierten PHH mit einem Antikörper gegen das hepatozyten-typischen Intermediärfilament CK 18 gefärbt. In Relation zur Gesamtzellzahl gefärbt mit Hoechst konnte eine Reinheit von  $92,3 \pm 3,2\%$  ermittelt werden.

Mittels 20-minütiger selektiver Adhärenztrennung wurden die KC von den restlichen NPC getrennt. Dabei wurden  $1,9 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$  viable KC/g Lebergewebe isoliert. Die Viabilität der circa 5  $\mu\text{m}$  großen Zellen mit geringen Zytoplasma/Zellkern-Verhältnis lag bei  $92,8 \pm 3,5\%$ . In Suspension fielen die KC vor allem durch ihre granuliert und gezahnte Zelloberfläche auf. Adhärert zeigten sich kleine, runde Zellen mit einem prominenten Zellkern. Um die Reinheit zu bestimmen, erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung mit dem KC spezifischen Oberflächenprotein CD68. Nach mikroskopischer Beurteilung der durchgeführten Färbung wurde eine Reinheit von  $81,0 \pm 5,4\%$  detektiert.

Die LEC konnten mit Hilfe des MACS<sup>®</sup>-Systems von den HSC getrennt werden. Es wurden  $2,7 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$  viable LEC/g Lebergewebe mit einer Viabilität von  $95,6 \pm 2,8\%$  isoliert. In Suspension konnten die LEC anhand ihrer Größe von circa 10  $\mu\text{m}$  identifiziert werden. Auf mit Rattenschwanzkollagen beschichteten Platten adhärert, zeigten die LEC eine für Endothelzellen typische spindelförmige Zellform gepaart mit einem ovalen Zellkern. Identifiziert wurden die LEC mit dem mesenchymalen Zellmarker Vimentin. Nach Bestimmung der Vimentin positiven Zellen in Relation zur Gesamtzellzahl wurde eine Reinheit an LEC von  $81,0 \pm 1,7\%$  ermittelt.

Die HSC, welche die CD31 negative Fraktion darstellen, konnten mit einer Ausbeute von  $4,7 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$  viable HSC/g Lebergewebe und einer Viabilität von circa  $89,6 \pm 3,8\%$  isoliert werden. In der Zellsuspension stellten sich unterschiedlich große, stark granuliert Zellen dar. Nachdem die HSC adhärert hatten, konnten die HSC-typischen Lipidtröpfchen beobachtet werden. Zur Identifikation wurde Antikörper gegen Glial fibrillary acidic protein (GFAP) genutzt. In der mikroskopischen Beurteilung wurde eine Reinheit von  $93,0 \pm 1,7\%$  ermittelt.

Durch weitere Untersuchungen der einzelnen NPC-Fractionen unter zu Hilfenahme von Gegenfärbungen konnte gezeigt werden, dass in allen Fraktionen vereinzelt auch die anderen NPC nachweisbar waren. Es

konnten jedoch keine parenchymalen Leberzellen mit CK18 als spezifischen Marker für PHH und CK19 als Marker für Cholangiozyten in den verschiedenen NPC-Fractionen nachgewiesen werden.

### *Funktionelle Charakterisierung und Kultivierung der einzelnen NPC*

Zur funktionellen Charakterisierung der KC wurde ihre Makrophagen-typische Eigenschaft der Phagozytose, unter zu Hilfenahme von fluoreszenzmarkierten Latex Beads, untersucht. Die Ergebnisse zeigten eine Aufnahme und intrazelluläre Anreicherung der Latex Beads. Nach Identifikation und Charakterisierung der KC wurde das Kulturverhalten untersucht. Hierfür erfolgte eine KC-Kultivierung über 5 Tage. Es zeigte sich sowohl eine Abnahme der Zellviabilität als auch von intrazellulärem ROS. Zusätzlich wurde der Einfluss von verschiedenen Sera (autologes Serum, FCS, ohne Serum) auf die KC-Aktivierung und die Zellviabilität untersucht. KC, die mit autologem Serum oder ohne Serum kultiviert wurden, zeigten innerhalb der ersten 48 Stunden einen starken Abfall der Zell-Aktivität. In der mikroskopischen Kontrolle konnte ein vermehrtes Absterben der Zellen beobachtet werden. Der Zusatz von FCS hatte einen positiven Effekt auf die KC-Viabilität, welche nach Trypan-Blau Färbung mikroskopisch kontrolliert wurde. Erst nach circa 5 Tagen wurde ein Zellsterben beobachtet. Die Zell-Aktivität der KC zeigte sich in der Kultivierung mit FCS haltigem Medium konstant, während das ROS-Level im Verlauf ansteigt.

Alle LEC in der Leber zeigen die Fähigkeit zur LDL-Aufnahme. Nachdem die LEC zusammen mit fluoreszierenden LDL-Partikel inkubiert wurden, zeigte sich nach kurzer Zeit eine Akkumulation der LDL-Partikel um die Zellmembran. Nach einer Behandlungszeit von 24 Stunden wurde ein Teil der substituierten Partikel intrazellulär aufgenommen. Die Kultivierung der isolierten LEC erfolgte ebenfalls über 5 Tage. Die Zellviabilität, welche mittels XTT-Assay bestimmt wurde, zeigte einen deutlichen Anstieg über den Kultivierungszeitraum. In den parallel durchgeführten mikroskopischen Kontrollen konnte zusätzlich die Proliferation der LEC über die Kultivierungsdauer beobachtet werden.

Das charakteristischste Merkmal der HSC ist die Speicherung von autofluoreszierendem Retinol, welches übereinstimmend mit den Lipidtröpfchen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden konnte. Auch die HSC wurden über 5 Tage, unter Kontrolle der Zellviabilität, welche mit dem XTT- und SRB-Assay bestimmt wurde, kultiviert. Sowohl die täglichen mikroskopischen Kontrollen, als auch die an jedem Tag durchgeführte Bestimmung der Gesamtproteingehaltes dienen dem Nachweis einer möglichen Differenzierung der HSC in Myofibroblasten. Es konnte sowohl ein Anstieg der Zell-Aktivität, als auch der gesamten Proteinmenge beobachtet werden. In den mikroskopischen Kontrollen zeigten sich stets lebende Zellen, welche jedoch nach längerer Kultivierungszeit ihre Form veränderten.

### *Kupfer-Zell-Antwort nach Hepatozyten-Stress/-Schädigung*

Es sollte ein Model etabliert werden, in dem die KC-Aktivierung und KC-Reaktion nach Hepatozytenschädigung abgebildet wird. Um den Stress/ die Schädigung der PHH zu simulieren, wurden die PHH eine Stunde lang mit den hepatotoxischen Substanzen APAP und DIC (100  $\mu$ M) behandelt. Zur Evaluierung des Hepatozytenstress bzw. der Hepatozytenschädigung wurden die Zell-Aktivität (XTT-Assay) und das intrazelluläre ROS-Level (DCF-Assay) genutzt. In dieser Übersichtsarbeit wird auf nur zwei der drei untersuchten Donoren eingegangen. Eine vollständige Betrachtung der drei Donoren findet sich im Journal Beitrag Kegel et al. (2015). Auf Grund der großen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten konnten die Daten nicht zusammengefasst werden, sondern wurden als Einzelfälle betrachtet. Bei der Untersuchung von Effekten der hepatotoxischen Substanzen auf die PHH, fallen zuerst unterschiedlich ROS-Level in den Kontrollen auf. Obwohl die zwei Donoren unterschiedliche basale oxidative Stresslevel aufweisen, steigt bei beiden Donoren nach Stimulation mit APAP das ROS-Level leicht (Donor A) bis moderat (Donor B) an. Nach der Stimulation mit DIC konnte keinen Unterschied zu den Kontrollwerten beobachten werden. Zusätzlich zu dem ROS-Spiegel wurde auch die Zell-Aktivität bestimmt. Bei Donor A kann ein substanzabhängiger Anstieg der Zell-Aktivität beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich bei Donor B ein konstantes Zell-Aktivitätslevel nach Substanzbehandlung.

Nach der einstündigen Inkubationszeit wurde der Überstand von den PHH auf die KC überführt. Die KC wurden anschließend für 2 Stunden mit den PHH-Überständen behandelt. Zur Evaluation der KC-Aktivierung wurde neben der ROS-Bildung (DCF-Assay) auch die Zell-Aktivität (XTT-Assay) bestimmt. Eine spezifische KC-Reaktion wurde anhand der Sekretion von pro- und anti-inflammatorische Zytokine beurteilt.

Donor A ist ein 50 Jahre alter Mann, der auf Grund einer kolorektalen Lebermetastase Leberteile reseziert wurde. Nach Stimulation der KC mit den Überständen der mit APAP oder DIC behandelten PHH konnte ein substanzabhängiger Anstieg der Zell-Aktivität als auch der ROS-Produktion beobachtet werden. Im Rahmen der KC-Aktivierung konnte nach Stimulation mit APAP behandelten PHH eine vermehrte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu zeigt sich kein Effekt auf die IL-6-Ausschüttung. Werden die KC andererseits mit den Überständen von mit DIC behandelten PHH stimuliert, steigt sowohl der TNF- $\alpha$ - als auch der IL-6-Spiegel an. Bei der Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zeigte sich kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle. Die Bildung von PGE-2 fällt in diesem Donor (A) substanzabhängig ab. Der beobachtete Abfall ist stärker nach Stimulation mit DIC behandelten PHH im Vergleich zu mit APAP behandelten PHH (Tabelle 2, Seite 14).

Im Kontrast zu Donor A steht Donor B, ein 57 jähriger Diabetiker, der an einem Klatskin Tumor erkrankt war. Klatskin Tumoren sind spezielle Typen des cholangiozellulären Karzinoms und weisen auf Grund der auftretenden Galle-Abflussstörung gestresstes oder schon geschädigtes Lebergewebe auf. Präoperativ hat der Patient zusätzlich eine Pfortaderembolisation erhalten. Die KC-Aktivität ermittelt durch die Messung der ROS zeigt, verglichen mit der Kontrolle, einen klaren substanzabhängigen Abfall nach Stimulation der KC mit den Überständen von mit APAP oder DIC behandelten PHH. Nach Stimulation mit DIC behandelten PHH ist der Abfall wesentlich intensiver als mit APAP behandelten PHH. Der Effekt auf die Zell-Aktivität ist vollständig entgegengesetzt. Es konnte ein substanzabhängiger starker Anstieg der Zell-Aktivität gemessen werden. Die KC-Reaktion nach Stimulation mit den Überständen von mit APAP behandelten PHH zeigt weder in der TNF- $\alpha$  und IL-6 noch in der IL-10 Ausschüttung eine Veränderung im Vergleich zur Kontrolle. Nur in der PGE<sub>2</sub> Sekretion konnte ein deutlicher Anstieg beobachtet werden. Nach Stimulation mit DIC behandelten PHH steigt sowohl die TNF- $\alpha$ - als auch die IL-10-Ausschüttung an. Ähnlich wie bei Donor A fällt auch bei Donor B nach Stimulation der KC mit den Überständen von mit DIC behandelten PHH das PGE<sub>2</sub>-level im Vergleich zur Kontrolle ab. Nur in der IL-6 Bildung zeigt sich keine Veränderung (Tabelle 2).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine donor- und medikamentenspezifische KC-Aktivierung und KC-Reaktion.

## Diskussion

Um ein funktionierendes und reproduzierbares humanes *in vitro* Lebermodell im Sinne von Ko-Kultur-Systemen oder „Tissue Engineering“ zu etablieren, ist es unabdingbar, über parenchymale Leberzellen und NPC in guter Qualität und ausreichender Quantität zu verfügen. Anhand dieser neuen *in vitro* Lebermodelle könnten pathophysiologische Reaktionen, zum Beispiel im Rahmen von DILI, möglichst nah an der *in vivo* Situation nachempfunden werden.

Im Rahmen dieser Promotion wurde ein Zellisoliationsprotokoll etabliert, welches es ermöglicht, neben den PHH auch alle NPC aus humanen Lebergewebeproben zu isolieren. Es wurden gleichzeitig die PHH und die einzelnen NPC-Populationen mit einer hohen Reinheit und guten Ausbeute aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden die Zellen anhand von spezifischen Oberflächenproteinen und anhand typischer Eigenschaften identifiziert und charakterisiert. Zusätzlich wurde das Verhalten der einzelnen NPC-Typen in Monokulturen über einen Zeitraum von 5 Tagen untersucht. Im letzten Abschnitt dieser Promotion wurde ein PHH-KC-Modell zur Untersuchung von immunologischen Reaktionen im Rahmen von DILI etabliert.

Bisherige Isolationsprotokolle beschreiben meist nur die Isolation einzelner NPC-Populationen von oftmals anderen Spezies, zum Beispiel der Maus. Daten zur Isolation von humanen NPC sind kaum zu finden. Das in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll basiert auf einer bereits veröffentlichten Anleitung zur PHH-

Isolation<sup>12</sup>. Um neben den PHH auch die NPC in guter Qualität und Quantität zu isolieren, wurde das Protokoll modifiziert. Die Proteasen, welche in der Kollagenase enthalten sind, wurden beispielsweise durch die Substitution von 10% FCS gehemmt. Das vermehrte Angebot an Proteinen vermindert die Proteasewirkung an den zu isolierenden Zelle und den Abbau der Kollagenase. Durch die Substitution von FCS ist nicht nur der Verdauungsvorgang milder, sondern es ermöglicht auch längere Verdauzeiten. Dieser optimierte Isolationsprozess ermöglicht es neben den PHH auch alle NPC in guter Qualität und Quantität zu isolieren.

Mit Hilfe ihrer Eigenschaft in kurzer Zeit auf Plastik-Zellkulturplatten zu adhären, wurden die KC von den übrigen NPC getrennt. Die Ausbeute an KC lag bei  $1,9 \times 10^6$  viable KC/g Lebergewebe mit einer Reinheit von 81%. Zur Bestimmung der Reinheit wurden das makrophagenspezifische Oberflächenprotein CD68, welches auch auf KC exprimiert wird, und die KC-spezifische Eigenschaft der Phagozytose genutzt. Alabraba et al. isolieren mit ihrem Protokoll  $2,3 \times 10^6$  KC/ g Lebergewebe mit einer Reinheit von 98%<sup>10</sup>. Bei diesen optimaleren Ergebnissen wurde jedoch auf die Isolation der weiteren NPC verzichtet, sodass der Isolationsvorgang besser auf die KC zugeschnitten werden konnte. Nach erfolgreicher Isolation der KC wurde das Verhalten der KC in Kultur untersucht. Die Ergebnisse zeigten über die Kultivierungszeit einen Abfall des ROS-Levels, welcher mit einem Abfall der Zellviabilität einherging. Mit der Erkenntnis, dass KC nach kurzer Zeit in Kultur sterben, ergibt sich nur ein kleines Zeitfenster, um mögliche Versuche zu planen. Trotz dieser Schwierigkeit eignen sich die isolierten KC nach der Isolation für weitere Experimente, zum Beispiel für Ko-Kultur-Modelle.

Die LEC wurden mittels des MACS<sup>®</sup>-Zellsortierungssystems mit einer Ausbeute von  $2,7 \times 10^5$  viable LEC/g Lebergewebe, einer Viabilität 96% und einer Reinheit von 81% isoliert. Der Vergleich mit anderen humanen Daten ist nur schwer möglich, da nur Protokolle zur Isolation von LEC aus kompletten Organen existieren. Extrapoliert man die dort angegebenen Daten an, so ergeben sich Ausbeuten von  $10^3$  bis  $10^6$  LEC/g Lebergewebe mit einer Viabilität von ca. 90%<sup>6</sup>. Die von uns erzielten Ausbeuten liegen damit im oberen Drittel dieser Studien. Die isolierten LEC wurden mit dem mesenchymalen Marker Vimentin und der LEC typischen Aufnahme von acetyliertem LDL charakterisiert<sup>7</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass es möglich ist die isolierten LEC zu kultivieren, sondern auch dass sich die Zellen in Kultur vermehren. Da sich die LEC in Kultur vermehren eignen sie sich sehr gut für weitere Experimente. Problematisch anzusehen ist jedoch, dass nicht genau definiert werden kann aus welchem Bereich der Leber die einzelnen LEC stammen, sodass aktuell von einer LEC-Mischkultur ausgegangen werden muss. Da die Eigenschaften und Funktionen der LEC von ihrer intrahepatischen Lokalisation abhängig sind, sollten die ebenso isolierten LEC unter Vorbehalt eingesetzt werden.

HSC wurden mit einer Ausbeute von  $4,7 \times 10^5$  viable HSC/g Lebergewebe und einer Reinheit von circa 93% isoliert. Im Vergleich zu Friedman und Koautoren werden mit dem hier beschriebenen Verfahren doppelt so viele HSC mit ähnlicher Reinheit isoliert<sup>8</sup>. Zur Identifizierung der isolierten HSC wurde sowohl GFAP als auch das intrazellulär gespeicherte Retinol genutzt. Die auf Kollagen ausplattierten Zellen wurden über 5 Tage kultiviert. Während der Kultivierung veränderten die HSC ihre Morphologie, in Verbindung mit einer vermehrten Proteinsynthese. Vermutlich wurden die HSC entweder durch den Isolationsprozess selbst oder durch die spezifischen Kulturbedingungen aktiviert und veränderten ihren Phänotyp hin zu Myofibroblasten. Der Anstieg des Gesamtproteingehaltes und der Zell-Aktivität ist am ehesten auf eine vermehrte Produktion von extrazellulärer Matrix zurückzuführen. Damit konnten die Beobachtungen anderer Autoren bestätigt werden<sup>9</sup>. Der Einsatz der isolierten HSC in *in vitro* Lebermodellen sollte kritisch betrachtet werden, da diese schon am dritten Tag nach der Isolation zu Myofibroblasten transdifferenziert sind. Nach der Differenzierung verlieren die Zellen HSC-typische Eigenschaften.

Zusammengefasst ermöglicht dieses Protokoll die Isolation der einzelnen Leberzelltypen in guter Qualität und Quantität. Anhand der durchgeführten Charakterisierung konnten die einzelnen Zell-Entitäten genau identifiziert werden. Durch die Untersuchung des Kulturverhaltens der einzelnen NPC-Populationen konnte gezeigt werden, dass KC sich trotz des kurzen Zeitfensters am besten für *in vitro* Lebermodelle eignen. Während die isolierten HSC in Myofibroblasten differenzieren, stellen die isolierten LEC eine



Mischkultur aller intrahepatischen LEC dar. Nur KC konnten als Reinkultur isoliert werden und zeigen keine Veränderungen in ihrer Morphologie, sodass die Etablierung eines PHH-KC-Lebermodells zur Untersuchung von DILI in Betracht gezogen wurde.

Obwohl die Inzidenz und der pathophysiologische Mechanismus von DILI nicht genau bekannt sind, wird vermutet, dass DILI für die Morbidität und Mortalität vieler Patienten verantwortlich ist. Für die pharmakologische Industrie kann dieser Zusammenhang massive ökonomische Einbußen bedeuten. Obwohl sehr verschiedene Hypothesen zur Entstehung von DILI existieren, ist diesen allen gemein, dass immunologische Reaktionen, wie zum Beispiel Sensitivierungsreaktionen, eine zentrale Rolle beigemessen wird<sup>13</sup>. Auf Grund der idiosynkratischen Natur von DILI ist es in *in vivo* Studien nur schwer möglich, die Pathophysiologie abzubilden. Die idiosynkratische Natur umfasst eine Spannweite der DILI-Reaktionen von Inflammation bis hin zur Immuntoleranz. Ein *in vitro* Lebermodell, das es ermöglicht, die immunologische Zell-Zell-Kommunikation in einer frühen Phase der medikamentenbedingten Hepatozytenschädigung abzubilden, könnten zum besseren Verständnis pathophysiologischer Mechanismen im Rahmen von DILI beitragen. Das finale Ziel dieser kumulativen Promotion ist es, ein solches Lebermodell aus isolierten PHH und KC zu etablieren.

KC, welche als leberspezifische Makrophagen einen Teil der NPC bilden, detektieren Zellstress und Gewebeschäden. Nachdem diese Signale verarbeitet wurden, haben KC nicht nur die Möglichkeit mit den hepatischen Zellen, wie den NPC, sondern auch mit dem gesamten Immunsystem zu kommunizieren. Die Hepatozyten sind verantwortlich für einen Großteil der Leberfunktionen, wie zum Beispiel dem Fremdstoffmetabolismus. Die aus einem Donor isolierten immunologisch kompatiblen PHH und KC bilden die Grundlagen für das *in vitro* Lebermodell. Zuerst wurden die isolierten PHH mit den hepatotoxischen Substanzen APAP und DIC inkubiert. Anschließend wurde der Überstand genutzt, um die KC zu stimulieren.

Die stimulierten PHH zeigen in dieser kurzen Zeit eine vermehrte ROS-Produktion nach Behandlung mit APAP, jedoch nicht nach der DIC-Behandlung. Damit konnten die Beobachtungen anderen Studien zu diesen beiden hepatotoxischen Substanzen bestätigt werden<sup>3,14</sup>. Innerhalb dieser einen Stunden Inkubationszeit konnte kein Abfall der Zellviabilität, welche mit Hilfe der Zell-Aktivität bestimmt wurde, beobachtet werden. Die stabile Zellviabilität in Relation mit dem leichten Anstieg des ROS-Levels, zeigt an, dass die gewählten Konzentrationen von 100 µM DIC oder 100 µM APAP in Kombination mit der Inkubationszeit von einer Stunde im subtoxischen Bereich liegen. Im Rahmen dieses Versuchs wurde somit vor allem Zellstress induziert. Irreversible toxische Veränderung, wie zum Beispiel Zellsterben, konnten nach Behandlung mit den hepatotoxischen Substanzen auch nicht mikroskopisch nachgewiesen werden. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die PHH-Reaktion auf hepatotoxische Medikamente abhängig ist von den einzelnen Donoren und deren Konstitution.

Zum Ausschluss einer direkten Medikamentenwirkung auf die KC wurden diese in einem Vorversuch direkt mit DIC und APAP stimuliert. Bei einer Konzentration von 100 µM zeigte sich weder bei APAP noch bei DIC eine Wirkung auf die KC. Mit diesen Untersuchungen konnten wir die Ergebnisse um Mueller et al. zu den verschiedenen DIC-Konzentrationen bestätigen<sup>14</sup>. Auf Grundlage der beschriebenen und diskutierten Ergebnisse kann die Annahme, dass Zellstress und keine Zellschädigung induziert wurde, vertreten werden. Auf Grund der Vorversuche wurde angenommen, dass der Effekt von den eingesetzten Substanzen auf die KC direkt nur eine sehr geringe bis gar keine Wirkung hat.

Tabelle 2. Zusammenfassung der KC-Aktivierung und KC-Reaktion nach Stimulation der KC mit den Überständen medikamentenbehandelter Hepatozyten

Donor	Substanzen	ROS-Bildung	Zell-Aktivität	IL-6	TNF-a	IL-10	PGE <sub>2</sub>
<b>A</b>	APAP	↑	↑	-	↑	-	↓
	DIC	↑↑	↑	↑	↑	-	↓↓
<b>B</b>	APAP	↓	↑	-	-	-	↑
	DIC	↓↓	↑↑	-	↑	↑	↓↓

↑ leichter Anstieg, ↑↑ deutlicher Anstieg, ↓ leichter Abfall, ↓↓ deutlicher Abfall, - keine Veränderung, alle Angaben beziehen sich auf die Kontrolle

Nachdem die KC mit den Überständen der substanzbehandelten PHH stimuliert wurden, konnte sowohl eine donorabhängige KC-Aktivierung als auch eine donorabhängige KC-Reaktion beobachtet werden (Tabelle 2). Nach genauer Analyse der Daten lässt sich trotz der geringen Datenlage schlussfolgern, dass bei Donoren mit leichter schon existierender Leberschädigung eher eine pro-inflammatorische Reaktion, am ehesten im Sinn einer M1-KC-Reaktion, nach KC-Stimulation mit substanzbehandelten PHH hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu führt die KC-Behandlung mit den Überständen substanzbehandelter PHH bei Patienten mit stark geschädigtem Lebergewebe, wie nach ausgeprägter Cholestase und lebereigenen Karzinomen (Donor B), zu einer anti-inflammatorischen M2-Reaktion. Anhand der Ergebnisse kann die Vermutung aufgestellt werden, dass die Vulnerabilität der verschiedenen Zelltypen und die Differenzierung in die KC-spezifischen Phänotypen mit dem Grad der Lebergewebsschädigung, zum Beispiel bedingt durch medizinische Maßnahmen, Alter und Lebensweise des Patienten, und bestehende Vorerkrankungen, korreliert. Diese Aussage kann mit Hilfe der wissenschaftlichen Arbeit um A. Parkinson et al. bestätigt werden. A. Parkinson zeigte, dass die Eigenschaften der Detoxifikation vom Alter und somit indirekt auch von dem Grad der Gewebeschädigung abhängen<sup>15</sup>. Untersucht man anhand der Ergebnisse den substanzspezifischen Effekt fällt auf, dass die DIC-Toxizität eine wesentlich stärkere KC-Aktivierung und Reaktion hervorruft als die APAP-Toxizität. Die substanzspezifischen Effekte bestätigen die Annahme, dass KC Leberzellstress detektieren können bevor eine Zellschädigung einsetzt. In diesem etablierten Lebermodell hatten die Zellen keinen direkten Kontakt miteinander. Durch Überführen des Überstandes erfolgte die Aktivierung der KC lediglich durch lösliche Mediatoren, wie Zytokine, gelöste endogene Proteine oder gebildete Haptene. Auch in anderen Studien konnte eine KC-Aktivierung durch verschiedenen Zytokine beobachtet werden<sup>5</sup>. KC können erste immunologische Signale detektieren und somit auf die Vorboten einer drohenden Lebergewebsschädigung, zum Beispiel durch Medikamente, reagieren. Nach der KC-Aktivierung könne die KC in verschiedene Phänotypen differenzieren und anschließend spezifische Immunreaktionen triggern.

Zu den Limitationen dieser Promotion zählt, dass es noch nicht möglich ist auch die Cholangiozyten aus dem Lebergewebe zu isolieren. Außerdem sollte in Zukunft eine Lösung gefunden werden, um die schnelle Differenzierung der HSC in Myofibroblasten zu verhindern oder hinauszuzögern. Um auch die LEC in *in vitro* Lebermodellen nutzen zu können, ist es notwendig die einzelnen LEC-Typen, abhängig von deren Lokalisation in der Leber, und nicht nur die LEC-Mischkultur zu isolieren. Längere Kultivierungszeiten für KC würden es ermöglichen, auch längere und komplexere Experimente zu planen. In dem KC-Modell ist die größte Limitation die niedrige Fallzahl. Die Ergebnisse müssen auf Grunde der patientenspezifischen KC-Reaktion als Einzelfall betrachtet werden. Auf Grund der geringen Fallzahl und das die untersuchten Patienten nicht gruppiert werden konnten, müssen die Ergebnisse und ihre Validität genau untersucht und kritisch diskutiert werden. In weiteren Versuchen wäre es sinnvoll eine Klassifikation der Donoren nach Schädigungsgrad des Gewebes vorzunehmen.

Dieses neue Protokoll ermöglicht zum ersten Mal eine zeitgleiche Isolation von PHH und den verschiedenen NPC aus demselben humanen Lebergewebe. Die anhand spezifischer Marker, typischer Morphologie und funktionellen Eigenschaften charakterisierten Leberzellen wurden in hoher Qualität und

Quantität isoliert. Eine Nutzung der NPC in rekonstruierbaren Lebermodellen, wie zum Beispiel im Rahmen von „Tissue Engineering“ und Ko-Kulturmodellen, ist möglich. Eine direkte Anwendung erfolgte in einem KC-PHH-Modell zur immunologischen Untersuchung der schwer nachvollziehbaren idiosynkratischen DILI-Reaktionen. Mit Hilfe dieses Modells konnte gezeigt werden, dass KC Hepatotoxizität detektieren können und eine donor- und substanzspezifische Immunreaktion hervorrufen. Die Nutzung von KC als Sensor von Hepatozytenstress und Hepatozytenschädigung ist unkonventionell. Bisherige *in vitro* Untersuchungen zum Thema DILI fanden hauptsächlich in Hepatozyten-Monokultur-Modellen statt. In diesen Modellen müssen nicht nur höhere Konzentrationen als *in vivo* eingesetzt werden, sondern auf die Abbildung immunologischer Reaktionen wird komplett verzichtet. Um das komplette Risiko von DILI zu erfassen reicht auch das in dieser Arbeit etablierte Modell nicht aus. Eine Überführung in ein KC-PHH-Ko-Kulturmodell sollte im weiteren Verlauf angestrebt werden, um die verschiedenen Interaktionsmöglichkeiten der Zellkommunikation von PHH und KC im Rahmen der DILI noch besser abbilden zu können. Mit dem etablierten KC-Modell wurden erste Schritte gemacht, um die hepatotoxischen und immunologischen Effekte im Rahmen von DILI besser zu verstehen. Außerdem wurde damit der Grundstein zur Etablierung weiterer physiologischer Ko-Kultur-Modelle im Bereich der Leber gelegt. Auch andere hepatische Erkrankungen, wie zum Beispiel nicht-alkoholische Fettleber, können mit einem solchen *in vitro* Lebermodell besser abgebildet werden. Diese Art von Modell kann nicht nur im Rahmen hepatischer Untersuchungen Anwendung finden, sondern auch in andere Organe, wie die Lunge, übertragen werden. Die Arbeit trägt damit nicht nur zu einer Verbesserung der Medikamentensicherheit bei, sondern ermöglicht die Etablierung *in vivo* naher *in vitro* Modelle.

## Literaturverzeichnis

1. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol* 2013;58:593-608.
2. Chen M, Vijay V, Shi Q, Liu Z, Fang H, Tong W. FDA-approved drug labeling for the study of drug-induced liver injury. *Drug Discov Today* 2011;16:697-703.
3. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. 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* 2013;87:1315-530.
4. Si-Tayeb K, Lemaigre FP, Duncan SA. Organogenesis and development of the liver. *Dev Cell* 2010;18:175-89.
5. Wan J, Benkdane M, Teixeira-Clerc F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2014;59:130-42.
6. Lalor PF, Lai WK, Curbishley SM, Shetty S, Adams DH. Human hepatic sinusoidal endothelial cells can be distinguished by expression of phenotypic markers related to their specialised functions in vivo. *World J Gastroenterol* 2006;12:5429-39.
7. March S, Hui EE, Underhill GH, Khetani S, Bhatia SN. Microenvironmental regulation of the sinusoidal endothelial cell phenotype in vitro. *Hepatology* 2009;50:920-8.
8. Friedman SL, Rockey DC, McGuire RF, Maher JJ, Boyles JK, Yamasaki G. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture. *Hepatology* 1992;15:234-43.
9. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest* 2013;123:1902-10.
10. Alabraba EB, Curbishley SM, Lai WK, Wigmore SJ, Adams DH, Afford SC. A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells. *J Immunol Methods* 2007;326:139-44.
11. Rajan N, Habermehl J, Coté MF, Doillon CJ, Mantovani D. Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nat Protoc* 2006;1:2753-8.
12. Nüssler AK, Nüssler, N. C., Merk, V., Brulport, M., Schormann, W., Hengstler, J. G. The Holy Grail of Hepatocyte Culturing and Therapeutic Use. *Strategies in Regenerative Medicine*. New York: Springer: In: Santin M, ed.; 2009.
13. Chalasani NP, Hayashi PH, Bonkovsky HL, et al. ACG Clinical Guideline: the diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury. *Am J Gastroenterol* 2014;109:950-66; quiz 67.
14. Mueller D, Müller-Vieira U, Biemel KM, Tascher G, Nüssler AK, Noor F. Biotransformation of diclofenac and effects on the metabolome of primary human hepatocytes upon repeated dose exposure. *Eur J Pharm Sci* 2012;45:716-24.
15. Parkinson A, Mudra DR, Johnson C, Dwyer A, Carroll KM. The effects of gender, age, ethnicity, and liver cirrhosis on cytochrome P450 enzyme activity in human liver microsomes and inducibility in cultured human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;199:193-209.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Victoria Kegel, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Isolation und Charakterisierung von primären humanen Leberzellen und deren Anwendung in in vivo nahen in vitro Lebermodellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

---

Unterschrift

## Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Victoria Kegel hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Victoria Kegel\***, Daniela Deharde\*, Elisa Pfeiffer, Daniel Seehofer und Georg Damm; Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells, JoVE (Journal of Visualized Experiments); 2016

Beitrag im Einzelnen:

- Teile der Planung, Koordination und Durchführung der Zell-Isolation
- Teile der Identifikation der NPC
- Mitarbeit bei der Durchführung der Literaturrecherche
- Schreiben des Artikels

Publikation 2: Elisa Pfeiffer\*, **Victoria Kegel\***, Katrin Zeilinger, Jan G Hengstler, Andreas K Nüssler, Daniel Seehofer und Georg Damm; Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells; Exp Biol Med (Maywood) 2015;240:645-56

Beitrag im Einzelnen:

- Mitarbeit bei der Durchführung der Literaturrecherche
- Etablierung der funktionellen Charakterisierungstests
- Auswertung der Daten
- Planung, Koordination und Durchführung der KC-Isolation
- Kultivierung und Charakterisierung der KC

Publikation 3: **Victoria Kegel**, Elisa Pfeiffer, Britta Burkhardt, Jia L. Liu, Katrin Zeilinger, Andreas K. Nüssler, Daniel Seehofer, und Georg Damm; Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human In Vitro Liver Model: An Approach to Study DILI; Mediators Inflamm 2015;2015:640631.

Beitrag im Einzelnen:

- Durchführung der Literaturrecherche
- Planung, Koordination und Durchführung der KC-Isolation
- Kultivierung und Charakterisierung der KC
- Durchführung von 90% der Experimente
- Schreiben des Artikels

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

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

---

## Originalarbeiten als Promotionsleistung

**Victoria Kegel\***, Daniela Deharde\*, Elisa Pfeiffer, Daniel Seehofer und Georg Damm; Protocol for Isolation of Primary Human Hepatocytes and Corresponding Major Populations of Non-parenchymal Liver Cells, JoVE (Journal of Visualized Experiments); 2016

doi:10.3791/53069 (2016)

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























Elisa Pfeiffer\*, **Victoria Kegel\***, Katrin Zeilinger, Jan G Hengstler, Andreas K Nüssler, Daniel Seehofer und Georg Damm; Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells; *Exp Biol Med* (Maywood) 2015;240:645-56

doi: 10.1177/1535370214558025

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



























**Victoria Kegel**, Elisa Pfeiffer, Britta Burkhardt, Jia L. Liu, Katrin Zeilinger, Andreas K. Nüssler, Daniel Seehofer, und Georg Damm; Subtoxic Concentrations of Hepatotoxic Drugs Lead to Kupffer Cell Activation in a Human In Vitro Liver Model: An Approach to Study DILI; Mediators Inflamm 2015;2015:640631.

doi: 10.1155/2015/640631

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









































## Lebenslauf

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











## Komplette Publikationsliste

**Kegel V.**, Deharde D., Pfeiffer E., Seehofer D., Damm G., Simplified simultaneous isolation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells. The Journal of Visualized Experiments (JoVE), Published. IF: 1.19

**Kegel V.**, Pfeiffer E., Burkhardt B., Zeilinger K., Nüssler A.K., Seehofer D., Damm G., Subtoxic concentrations of hepatotoxic drugs lead to Kupffer cell activation in a human in vitro liver model - an approach to study DILI., „Live or Die: Choice Mechanisms in Stressed Cells“ - Mediators of Inflammation, Accepted. IF: 3.418

Pfeiffer E, **Kegel V**, Zeilinger K, Hengstler JG, Nüssler AK, Seehofer D, Damm G., Isolation, characterization, and cultivation of human hepatocytes and non-parenchymal liver cells., Exp Biol Med, 2014, Published. IF: 2.80

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit und den zugrunde liegenden Publikationen beigetragen haben.

Herr Prof. Dr. Daniel Seehofer, meinem Doktorvater, möchte ich für die Überlassung dieses spannenden Forschungsthemas. Durch seine fachliche Unterstützung und die kritischen Diskussionen in Lab-Meetings habe ich sehr viel gelernt. Er hatte stets ein offenes Ohr für mich und sorgte in der Gruppe für ein gutes Arbeitsklima.

In besonderem Maße möchte ich mich bei Dr. Georg Damm bedanken. Die Zusammenarbeit mit ihm in den letzten Jahren war für mich eine sehr große Freude. Die regelmäßige wissenschaftliche Betreuung war exzellent, so dass ich lernte auch das Gesamtbild wahrzunehmen. Er hat mich immer unterstützt und es ist ihm gelungen mich auch für scheinbar nebensächliche Dinge zu begeistern und meinen Forscherdrang stets wach zu halten. In gemeinsamen Diskussion konnte ich meine anfangs rudimentären Kenntnisse vertiefen.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Daniel Seehofer, insbesondere bei Theresa Schulz, Elisa Pfeiffer, Jennifer Golembus, Anja Schirmmeier, Melanie Kießig, Daniela Deharde und Sebastian Sperling für die Schaffung einer unvergesslichen Arbeitsatmosphäre, den wissenschaftlichen und sozialen Austausch sowie die großartige Unterstützung bedanken. Speziell möchte ich dabei Jia L. Liu, Teresa Schönfeld und Susanna Lehman hervorheben, denen ich beim Erstellen und Planen ihrer Daten für ihre Bachelor-/Master-Arbeiten helfen durfte. Die Betreuung und neue Verantwortung war für mich äußerst lehrreich.

Vor allem möchte ich mich bei den Ko-Autoren und Ko-Autorinnen meiner Publikationen für die konstruktiven Denkanstöße bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern Lutz und Margit Sabine Kegel sowie meinem kleinen Bruder Max Vincent Kegel und natürlich auch bei Erik Andreas Hübner für die stets liebevolle Unterstützung bedanken, wodurch es mir möglich war mein Studium durchzuführen und mich wissenschaftlich zu verwirklichen.