

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

DISSERTATION

Isolierung, serumfreie Kultivierung und Phänotypisierung  
hepatischer Progenitorzellen aus humanen gesunden und  
zirrhatischen Resektaten

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Patrick Kupczyk

aus Berlin

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. M. Glanemann  
                          2. Prof. Dr. A. Nüssler  
                          3. Priv.-Doz. Dr. med. R. Pfitzmann

Datum der Promotion: 03.06.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Leber im Fokus der Regenerativen Medizin</b>	<b>1</b>
1.1.1 Vom Leberversagen zur Therapie	2
1.1.2 Alternative Therapieansätze	3
1.1.3 Der Begriff der Stammzelle	6
<b>1.2 Die Leberregeneration</b>	<b>8</b>
1.2.1 Mechanismen der Regeneration	8
1.2.2 Kandidaten für adulte Stamm- und Progenitorzellen der Leber	10
1.2.3 Debatte zur Stammzellnische	13
<b>1.3 Isolierung und Kultivierung adulter Stammzellen</b>	<b>14</b>
1.3.1 Isolierung	14
1.3.2 Kultivierung	15
1.3.3 Charakterisierung	16
1.3.4 Limitationen	17
<b>1.4 Zirrhotische Leber als Reservoir für adulte Stammzellen</b>	<b>18</b>
<b>2. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG DER ARBEIT</b>	<b>20</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>22</b>
<b>3.1 Umriss des Projektablaufes</b>	<b>22</b>
<b>3.2 Fein- und Biochemikalien</b>	<b>23</b>
<b>3.3 Leberteilresektate</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Kulturmedien</b>	<b>25</b>
3.4.1 Hepatozyten-Inkubationsmedium	25
3.4.2 Mitaka-Medium	26
3.4.3 Inkubationsmedium der Feederzellen	26
<b>3.5 Isolierung der primären Zellsuspension</b>	<b>27</b>
3.5.1 Reagenzien und Geräte	27
3.5.2 Kollagenase-Perfusionstechnik	28

---

<b>3.6</b>	<b>Fraktionierungen</b>	<b>30</b>
3.6.1	Dichtegradienten	30
3.6.2	Dichtegradientenzentrifugation nach Knobeloch	30
3.6.3	Separation nach dem Mitaka-Protokoll	31
<b>3.7</b>	<b>Kultivierung</b>	<b>32</b>
3.7.1	Beschichtungen der Mikrotiterplatten	32
3.7.2	Kulturbedingungen	32
3.7.3	Aussaat und Beobachtung	33
3.7.4	Passage auf einen Feeder-Layer	33
<b>3.8</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>34</b>
3.8.1	Geräte und Chemikalien	34
3.8.2	Primer	34
3.8.3	Manuelle Mikrodissektion	35
3.8.4	RNA-Extraktion	36
3.8.5	Reverse Transkription	36
3.8.6	Polymerase-Kettenreaktion	36
<b>3.9</b>	<b>Immunfluoreszenzfärbungen</b>	<b>39</b>
3.9.1	Geräte und Chemikalien	39
3.9.2	Histologische Schnitte	39
3.9.3	Antikörper	40
3.9.4	Färbeprotokolle	40
<b>3.10</b>	<b>Software</b>	<b>42</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolierung und Anreicherung der koloniebildenden Zellpopulation</b>	<b>43</b>
4.1.1	Kollagenase-Perfusion und Fraktionierung	43
4.1.2	Effizienz der Fraktionierungen	44
4.1.3	Effizienz des K-Gradienten	45
<b>4.2</b>	<b>Kultivierung der koloniebildenden Zellpopulation</b>	<b>46</b>
4.2.1	Kultivierung unter serumfreien Bedingungen im Zeitverlauf	46
4.2.2	Proliferationskapazität der Zellkolonien in serumfreier Kultur	48
4.2.3	Übertragung und Kokultur auf einem Feederlayer	51

---

<b>4.3</b>	<b>Phänotypisierung der koloniebildenden Zellpopulation</b>	<b>52</b>
4.3.1	Morphologische Aspekte	52
4.3.2	RT-PCR	55
4.3.3	Immunfluoreszenzfärbungen	56
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>59</b>
<b>5.1</b>	<b>Evaluation der Isolierung und ihre Grenzen</b>	<b>59</b>
5.1.1	Auswertung der Fraktionierung	59
5.1.2	Gegenüberstellung gesunder und zirrhotischer Resektate	62
5.1.3	Weitere Limitationen	64
<b>5.2</b>	<b>Überleben und Wachstum unter serumfreien Konditionen</b>	<b>65</b>
5.2.1	Einfluss des Serums auf die Kultivierung	65
5.2.2	Spontane und induzierte Expansion	67
<b>5.3</b>	<b>Die Identität des koloniebildenden Zelltyps</b>	<b>70</b>
5.3.1	Betrachtungen zur Zellmorphologie	70
5.3.2	Das Expressionsprofil im Kontext der Fachliteratur	71
5.3.3	Überlegungen zu einer möglichen neoplastischen Identität	76
5.3.4	Limitationen der Charakterisierung	77
<b>5.4</b>	<b>Hinweise zur Lokalisation hepatischer Progenitorzellen</b>	<b>78</b>
<b>5.5</b>	<b>Eignung der Progenitorzellen für regenerative Verfahren</b>	<b>79</b>
<b>5.6</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>83</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</b>	<b>95</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>96</b>
<b>10.</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>97</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>2-AAF</b>	2-Acetylaminofluoren
<b>ADHLC</b>	Adult-derived human liver stem/progenitor cell
<b>AFP</b>	Alpha-1-Fetoprotein
<b>ASMA</b>	Alpha-smooth muscle actin
<b>BAL</b>	Bioartificial liver device
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin
<b>CaCl<sub>2</sub>(2·H<sub>2</sub>O)</b>	Calciumchlorid-Dihydrat
<b>CCC</b>	Cholangiocellular carcinoma
<b>CD44</b>	Cluster of differentiation 44
<b>cDNA</b>	Complementary deoxyribonucleic acid
<b>CK</b>	Cytokeratin
<b>Cx32</b>	Connexin 32
<b>CYP</b>	Cytochrom p450-Monooxygenase
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DHC</b>	Ductus hepatocholedochus
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGTA</b>	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
<b>EpCAM</b>	Epithelial cell adhesion molecule
<b>ES</b>	Embryonale Stammzelle/n
<b>FACS</b>	Fluorescence activated cell sorting
<b>FCS</b>	Fetal calf serum
<b>HCC</b>	Hepatocellular carcinoma
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<b>HFF</b>	Human foreskin fibroblasts
<b>HGF</b>	Hepatocyte growth factor
<b>hHpSC</b>	Human hepatic stem cell
<b>HNF-4<math>\alpha</math></b>	Hepatic nuclear factor 4 $\alpha$
<b>HPC</b>	Hepatic progenitor cell

---

<b>ID</b>	Identifikationsnummer
<b>IE</b>	Internationale Einheit
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>iPS</b>	Induzierte pluripotente Stammzelle/n
<b>KBZ</b>	Koloniebildende Zellen
<b>KCl</b>	Kaliumchlorid
<b>LDL</b>	Low density lipoprotein
<b>LETf</b>	Liver-enriched transcription factor/s
<b>MACS</b>	Magnetic activated cell sorting
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Magnesiumchlorid
<b>MSC</b>	Mesenchymal stem cell
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NCAM</b>	Neural cell adhesion molecule
<b>NPC</b>	Non-parenchymal cells
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid
<b>rpm</b>	Revolutions per minute
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b>SH</b>	Small Hepatocyte
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>WME</b>	Williams medium E

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Leber im Fokus der Regenerativen Medizin

Die Leber nimmt im Organismus des Säugetiers in zweierlei Hinsicht eine Sonderstellung ein. Zum Einen hat sie als zentraler Dreh- und Angelpunkt des gesamten Metabolismus eine beispiellose Schlüsselrolle für eine Vielzahl von Organsystemen inne. Neben lebensnotwendigen Funktionen des Intermediärstoffwechsels, der Biotransformation sowie der Giftung und Entgiftung von Xenobiotika sind ihr auch zahlreiche Syntheseleistungen (Serumproteine, Hormone, Galle) zuzuschreiben, die systemische Auswirkungen haben. Umso verheerender gestaltet sich eine Leberinsuffizienz; sie hat u. a. einen Ikterus, Hypoglykämie, Hypalbuminämie, eine hämorrhagische Diathese, zerebrale Ödeme und Infektionen zur Folge<sup>1</sup>. Die Akkumulation toxischer Metabolite (insbesondere des Ammoniaks) führt in letzter Konsequenz zur hepatischen Enzephalopathie bis hin zum hepatischen Koma. Ein kompletter Funktionsausfall der unpaaren Drüse ist unbehandelt mit dem Leben auf Dauer nicht vereinbar.

Auf der anderen Seite zeichnet sich die Leber durch eine bemerkenswerte Fähigkeit zur Regeneration aus<sup>2, 3</sup>. Bereits seit den dreißiger Jahren ist aus tierexperimentellen Studien bekannt, dass hepatische Gewebeverluste bis zu 70 Prozent *in vivo* vollständig erneuert werden können<sup>4</sup>. Nagetierlebern, die einer partiellen Zweidrittel-Hepatektomie unterzogen worden waren, wiesen nach fünf bis sieben Tagen wieder ihr Ausgangsgewicht auf<sup>5</sup>. Untersuchungen an Patienten, die sich im Rahmen von Lebendspenden als Donor zur Verfügung gestellt hatten, zeigten, dass zwölf Monate nach rechtsseitiger Hemihepatektomie 85 Prozent des ursprünglichen Lebervolumens wiederhergestellt waren<sup>6</sup>. Dabei bleiben viele der Mechanismen, die diesem Potential zur Selbsterneuerung zugrunde liegen, trotz intensiver Forschung für die Wissenschaft bis heute ungewiss<sup>7</sup>. Ein tieferes Verständnis der molekularen und zellbiologischen Vorgänge dieser Eigenschaft könnte der Medizin neue, ungeahnte Möglichkeiten der Anwendung eröffnen.

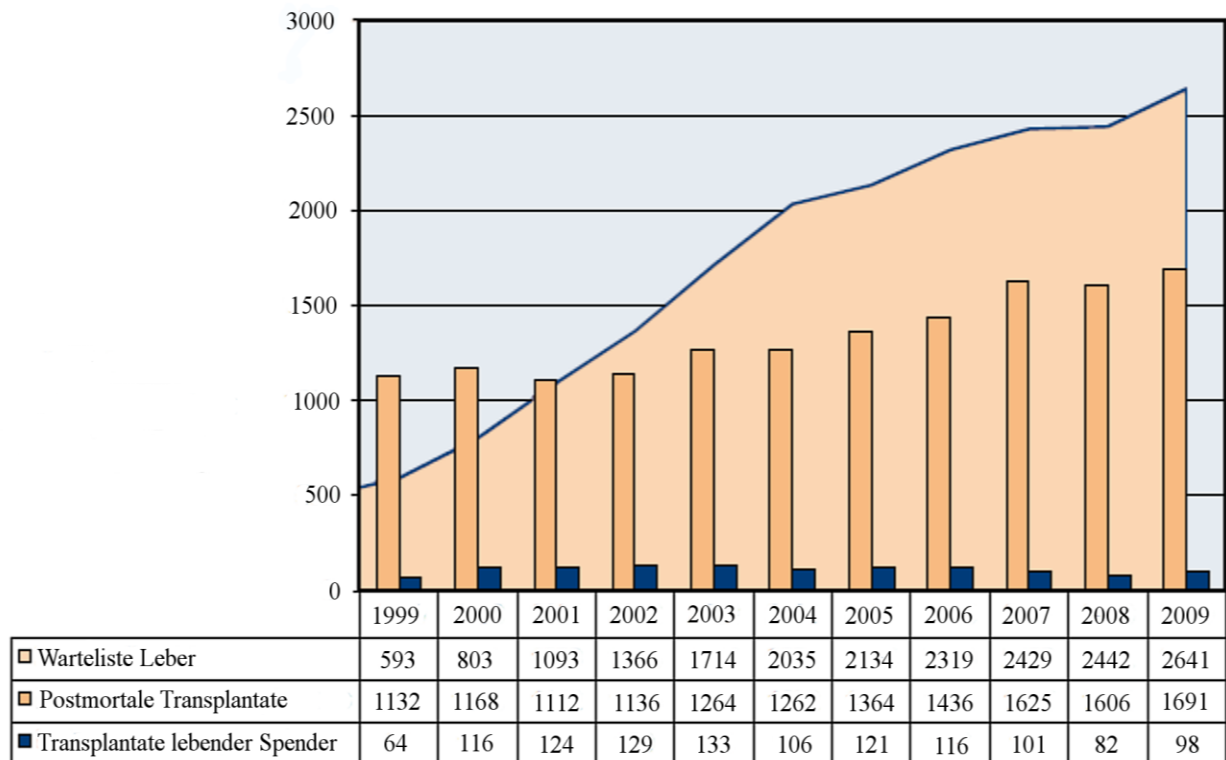
In diesem Abschnitt der Arbeit soll aufgezeigt werden, welcher klinische Nutzen sich aus dem Regenerationspotential der Leber ziehen ließe.



### 1.1.1 Vom Leberversagen zur Therapie

Die Leberinsuffizienz lässt sich allgemein in eine akute und eine chronische Verlaufsform einteilen, wobei letztere quantitativ dominiert<sup>8</sup>. Während die akute Leberinsuffizienz ein vollständiges Erlöschen der hepatischen Funktion innerhalb von wenigen Tagen (fulminantes Versagen) bis maximal vier Wochen beschreibt, handelt es sich beim chronischen Leberversagen um einen langsam progredienten Prozess, der bis zu mehreren Jahren andauern kann. Ein chronisches Leberversagen kann jederzeit auch akut entgleisen (*acute on chronic liver failure*). Liegt die Ursache des akuten Leberversagens zumeist in einem nekrotischen Zerfall der Hepatozyten aufgrund von Toxinen (z. B. Paracetamol, Drogen, Amatoxine) oder Erregern (fulminant verlaufende virale Hepatitiden), so geht das chronische Leberversagen in der Regel mit einer Leberzirrhose – dem irreversiblen fibrotischen Umbau der Leberstruktur mit funktionellem Defizit – unterschiedlichster Ätiologie einher<sup>1</sup>. Zu den häufigsten Auslösern hierfür zählt in den Industrieländern Alkoholabusus (ca. 50 %), dicht gefolgt von den chronischen Virushepatitiden B–D (ca. 45 %)<sup>8</sup>. Seltener Ursachen umfassen u. a. Autoimmunerkrankungen (Autoimmunhepatitis, primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis) oder hereditäre Stoffwechselstörungen (z. B. Hämochromatose, M. Wilson). Bei einer Inzidenz von 250/100.000 pro Jahr ist die Leberzirrhose mit einer hohen Morbidität und Mortalität belastet. Sie ist in Deutschland die häufigste alkoholbedingte Todesursache und ist global gesehen die fünfthäufigste Todesursache zwischen dem 25. und 45. Lebensjahr. Abgesehen vom funktionellen Defizit drohen eine Reihe von Komplikationen, wie beispielsweise portale Hypertension, Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, ein hepatorenales Syndrom und die Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms<sup>1, 8, 9</sup>. Trotz symptomatischer Maßnahmen lässt sich hierbei ohne kausale Behandlung eine terminale Leberinsuffizienz mit letalem Ausgang nicht verhindern.

Die einzige kurative Therapieoption der akuten und chronischen Leberinsuffizienz stellt bislang die orthotope Lebertransplantation dar<sup>10</sup>. Dabei setzen sich die Betroffenen den Risiken eines komplexen operativen Eingriffs und einer anschließenden lebenslangen medikamentösen Immunsuppression aus<sup>11</sup>. Ein weitaus gravierenderes Problem stellt die weltweit begrenzte Verfügbarkeit entsprechender Spenderorgane für die Transplantation dar; da der Organbedarf das Angebot in Europa um das 1,5-fache übersteigt (Abb. 1.1), beträgt die aktuelle mediane Wartezeit auf eine Spenderleber in Deutschland etwa 12 Monate, mit stetig wachsender Tendenz zu den Vorjahren<sup>12</sup>. Die Sterblichkeit auf der Warteliste lag im Jahre 2009 bei ca. 18 Prozent. Aufgrund der permanenten Organknappheit besteht der dringende Bedarf an therapeutischen Alternativen zur Lebertransplantation<sup>9</sup>.

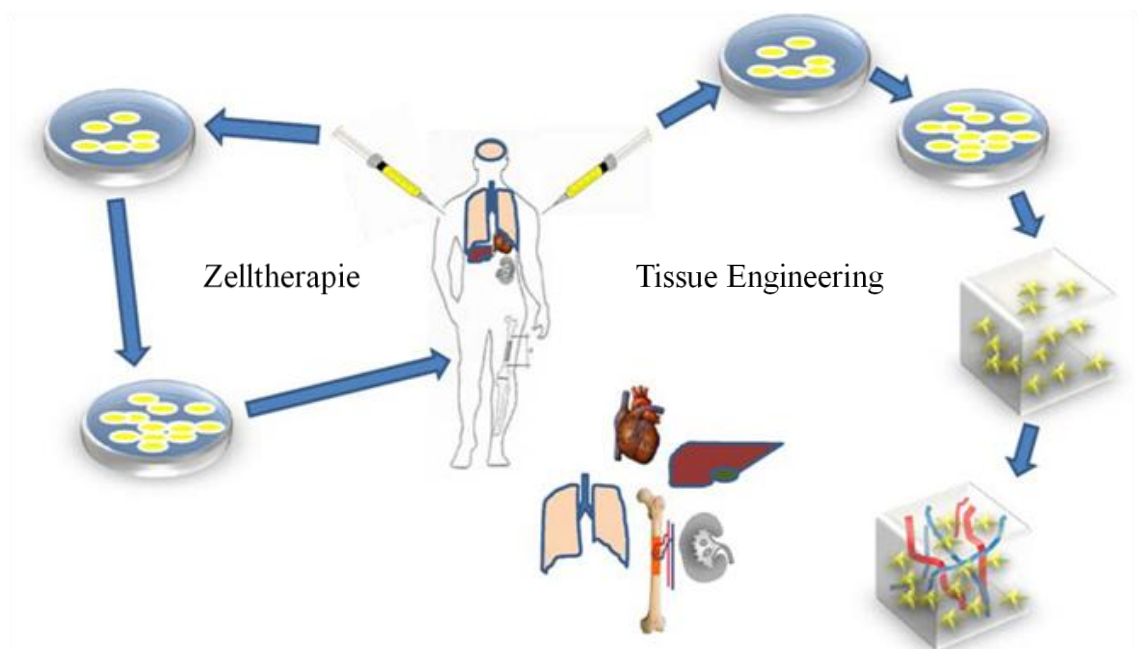


**Abbildung 1.1** Dynamik der Eurotransplant Warteliste für Lebern und der Lebertransplantate zwischen 1999 und 2009. Dargestellt ist die quantitative Entwicklung der jährlich gelisteten Empfängerkandidaten und der verfügbaren Lebertransplantate aus Lebend- und Leichenspenden. Die Grafik veranschaulicht die deutlich zunehmende Diskrepanz zwischen der Organnachfrage und dem entsprechenden Angebot (modifiziert nach Oosterlee und Rahmel, 2010)<sup>12</sup>.

### 1.1.2 Alternative Therapieansätze

Es haben sich in den letzten Jahren im Wesentlichen zwei vielversprechende, innovative Strategien aus der Regenerativen Medizin herauskristallisiert, die bislang noch experimentellen Charakter haben<sup>13</sup>. Dabei handelt es sich einerseits um das bioartifizielle Leberunterstützungssystem (*engl. bioartificial liver device, BAL*), andererseits um das Konzept der Zelltherapie<sup>14</sup>. Das BAL dient dem extrakorporalen Leberersatz, indem die Leberfunktion in Bioreaktoren durch Anzucht von Hepatozyten im dreidimensionalen Gefüge nachgeahmt wird. Damit wird diese Methode dem sog. *Tissue Engineering* zugeordnet, das sich zur Aufgabe gemacht hat, organoide Strukturen nach biologischem Vorbild *in vitro* nachzubilden<sup>15, 16</sup>. Mittels Perfusion des BAL mit Patientenplasma erfüllt das System den Zweck der Leberdialyse und kann darüber hinaus weitere metabolische Funktionen der Leber wahrnehmen<sup>17</sup>. Einige Studien berichten vom erfolgreichen supportiven Einsatz der BALs bei akutem Leberversagen zur temporären Überbrückung der Wartezeit bis zur Organtransplantation<sup>17, 18</sup>.

Weitaus umfangreicher sind die Daten zur Zelltherapie; hierunter versteht man das Einbringen (i.d.R. *per injectionem*) von Zellen in den Organismus, die dann direkt durch Implantation am Zielorgan oder indirekt durch Induktion humoraler Faktoren eine Erhaltung oder Besserung der Organfunktion bis hin zur Rekonvaleszenz bewirken sollen<sup>19</sup>. Aus zahlreichen Studien am Tiermodell geht hervor, dass die Transplantation adulter Hepatozyten die Leberfunktion bei akuter Leberinsuffizienz und kongenitalen Stoffwechseldefekten (z. B. Crigler-Najjar-Syndrom<sup>20, 21</sup>, LDL-Rezeptor-Defekt<sup>22</sup>) verbessern kann. Darüber hinaus haben reife Hepatozyten ihre Fähigkeit zur Proliferation im Gegensatz zu anderen adulten Zelltypen *in vivo* nicht verloren. In einigen Arbeiten wurde eine nahezu vollständige Repopulation der geschädigten Leber mit verabreichten Hepatozyten, sei es tierischer oder humaner Herkunft, beobachtet<sup>23, 24</sup>. Einige Autoren berichten aus Versuchen serieller Hepatozytentransplantationen an Mäusen von mindestens 86 Zellteilungen einzelner Hepatozyten ohne Funktionsverlust<sup>25</sup>.



**Abbildung 1.2 Strategien der Regenerativen Medizin.** Das Schaubild illustriert die beiden grundlegenden Ansätze zur Verwendung von Stammzellen. Die linke Seite zeigt die autologe Stammzelltherapie; aus dem Organismus werden die entsprechenden Stammzellen extrahiert, *in vitro* expandiert und schließlich wieder in das Individuum reinfundiert. Auf der rechten Seite wird das Prinzip des *Tissue Engineering* dargestellt; nach der Gewinnung und Propagation der Stammzellen erfolgt *in vitro* die Anzucht in einem dreidimensionalen Gerüst aus extrazellulärer Matrix und weiteren Zellen, ähnlich dem Aufbau des Zielorgans. Das künstliche Organ könnte extrakorporal genutzt oder eine Retransplantation *in vivo* durchgeführt werden, wo es nach Vaskularisierung seine Funktion aufnimmt (modifiziert nach Ehnert et al., 2009)<sup>15</sup>.

Jüngst wurde in klinischen Studien die Effektivität der Hepatozytentransplantation am Menschen bei hereditären monogenetischen Erkrankungen wie etwa dem Crigler-Najjar-Syndrom<sup>26</sup>, dem Morbus von Gierke<sup>27</sup> und bei Störungen des Harnstoffwechsels<sup>28</sup> nachgewiesen. Dabei wurde primär eine mittelfristige Besserung des klinischen Zustandes und funktioneller Parameter der Leber erzielt; so ließ sich im Sinne einer Stabilisierung bis zur Organtransplantation (*bridge-to-transplant*) Zeit gewinnen<sup>29</sup>. Gründe für das Ausbleiben eines dauerhaften Therapieerfolges werden in erster Linie in der fehlenden Persistenz der Spenderhepatozyten in der humanen Leber gesehen<sup>26</sup>. Nach mehrfachen Zelltransplantationen betrug bei Kindern mit angeborenem Argininosuccinat-Lyase-Mangel der Anteil an Donorhepatozyten in der Leber nach acht Monaten lediglich 19 Prozent<sup>30</sup>. Neben praktischen Variablen wie Qualität, Darreichungsform und Applikationsort der Hepatozyten, deren Optimierung Gegenstand der Forschung ist<sup>31</sup>, hängt die Repopulation der Leber von der immanenten Fähigkeit der Spenderzellen zur klonalen Expansion oder dem selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den Wirtshepatozyten ab<sup>32, 33</sup>. Letzteres existiert in Zuständen chronischer Lebererkrankungen nicht<sup>33</sup>; Ursachen für das funktionelle Defizit sind hier nicht vorrangig auf zellulärer Ebene, sondern in der pathologischen Histoarchitektur der Leber zu suchen<sup>15</sup>. Somit gewinnt der erste Punkt an Relevanz: Ein Zelltyp mit einer höheren Tendenz zur Proliferation könnte das Potential besitzen, die chronisch erkrankte Leber neu zu besiedeln und den Funktionsausfall langfristig zu kompensieren<sup>34</sup>.

Die entscheidende Hürde bei den Verfahren des BAL und der Zelltherapie ist die hohe Menge an funktionellen Hepatozyten, die für deren Anwendung derzeit benötigt werden<sup>15</sup>. So lag die bisher geringste Dosis an Hepatozyten, bei der ein klinischer Effekt nach Transplantation beim Menschen berichtet wurde, bei  $3 \times 10^8$  Zellen<sup>35</sup>. Auch in diesem Fall ist das Kontingent an verfügbarem Gewebe, aus dem die Hepatozyten isoliert werden könnten, beschränkt<sup>13, 14</sup>. Zudem erweisen sich Hepatozyten als schlecht kryokonservierbar, nur über kurzen Zeitraum anzüchtbar und *in vitro* praktisch teilungsunfähig. Mit zunehmender Dauer in Kultur dedifferenzieren sie und verlieren somit ihre Zellfunktion<sup>36</sup>. Aus dem fehlenden Wachstum ergibt sich zwangsläufig, dass der Großteil der verwendeten Hepatozyten allogenen (bei dem BAL z. T. sogar xenogenen) ist; mitunter wird die Abstoßung der immunogenen Leberzellen als Ursache für die durchwachsenen Ergebnisse der Zelltherapie am Menschen verantwortlich gemacht<sup>37</sup>.

Angesichts ihrer beachtlichen Tendenz zur Selbsterneuerung läge es nicht fern, dass die Leber selbst zur Überwindung der Ressourcenknappheit verhelfen könnte: Eine theoretisch unerschöpfliche Quelle für funktionelle Hepatozyten könnten hepatische Stammzellen darstellen.

### 1.1.3 Der Begriff der Stammzelle

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich nach Potten und Loeffler durch fünf Eigenschaften auszeichnen<sup>38</sup>:

- (1) Klonogenität
- (2) Die Fähigkeit zur Selbsterhaltung
- (3) Die Fähigkeit, eine große Zahl an Abkömmlingen hervorzubringen, die zu unterschiedlichen Gewebezellen differenzieren können
- (4) Die Fähigkeit, Gewebe nach Läsion zu regenerieren
- (5) Die Flexibilität in der Wahl der Optionen zur Differenzierung (sog. Plastizität)

Abhängig von der Bandbreite an Zelltypen, die aus einer Stammzelle hervorgehen kann, wird zwischen totipotenten, pluripotenten und multipotenten Stammzellen differenziert<sup>15</sup>. Totipotente und pluripotente Stammzellen sind dazu in der Lage, Gewebe aller drei Keimblätter hervorzubringen. Da dies *in vivo* ausschließlich auf embryonale Stammzellen zutrifft, werden diese Begriffe häufig synonym verwendet. Aus einer totipotenten Stammzelle kann ein vollständiger Organismus entstehen, während pluripotente Stammzellen im Gegensatz dazu kein extraembryonales Gewebe bilden können. Eine Verwendung embryonaler Stammzellen (ES) für Zelltherapie und Forschung wird aus Gründen der Ethik kontrovers diskutiert<sup>13</sup>; deren Gewinnung ist in Deutschland juristisch untersagt. Zudem haben Transplantationsversuche gezeigt, dass ES *in situ* ein beträchtliches tumorigenes Potential bergen<sup>39</sup>. Zurzeit erscheinen sie daher für therapeutische Zwecke nur bedingt geeignet.

Mit Zunahme des ontogenetischen Alters nimmt die Plastizität von Stammzellen ab. Stammzellen, die nur noch eine limitierte Zahl an Zelltypen heranreifen lassen können, werden als multipotent bezeichnet. Ein geringer Prozentsatz an Zellen, der in verschiedenen Organen postnatal nachweisbar ist, erfüllt diese Bedingung; es handelt sich um sog. adulte (auch: somatische) Stammzellen. Sie sind zeitlebens für die Gewebemöostase verantwortlich<sup>40</sup> und ihre Existenz ließ sich bisher vorrangig in Geweben mit hoher Erneuerungsrate (Knochenmark, Haut, Darm, Gonaden), sog. Wechselgeweben, zeigen<sup>15</sup>. Nach allgemeiner Auffassung gehen bei entsprechendem Bedarf (physiologischer Zellumsatz, pathologischer Zelluntergang) aus dem adulten Stammzellreservoir Zellpopulationen mit hoher Teilungsfrequenz hervor, die den Gewebeersatz gewährleisten. Da ihr Zellschicksal bereits in eine entscheidende Richtung gelenkt wurde und ihre Plastizität damit beschränkt ist, betrachtet man sie als determinierte Stammzellen. Dies sind die sog. Progenitorzellen.

Erfahrungswerten aus der Zellkultur zufolge besitzen embryonale und adulte Stammzellen gegenüber differenzierten Gewebezellen praktische Vorteile: Seit einiger Zeit bestehen Möglichkeiten, verschiedene Arten von Stammzellen *in vitro* über einen langen Zeitraum in undifferenziertem Zustand anzuzüchten und zu expandieren<sup>41</sup>. Zudem ist ihre Kryokonservierung unproblematisch, da sie dadurch ihre Proliferationskapazität nicht einbüßen. Trotz vieler ernüchternder Ergebnisse ist es durch Entwicklung geeigneter Protokolle bereits gelungen, verschiedenste Stammzellen *in vitro* zielgerichtet zu spezialisierten Gewebezellen heranreifen zu lassen<sup>42, 43</sup>. Damit wären in Bezug auf eventuelle Lebervorläuferzellen neue Ressourcen für Zelltherapie und BAL erschlossen, die hypothetisch unbegrenzt wären und ohne ethische Vorbehalte nutzbar wären<sup>40</sup>. Des Weiteren wäre – wie schon beim Knochenmark üblich – der Gewinn autologen Stammzellmaterials aus dem Patienten mit anschließender Propagation und Retransplantation denkbar<sup>15</sup>. So würde sich eine Immunsuppression mit all ihren Nachteilen erübrigen<sup>14</sup>. Auch direkte Transplantationen vermeintlicher adulter Stammzellen im Tiermodell zeigten positive Resultate. So konnte in Modellen mit selektivem Wachstumsvorteil für Transplantatzellen eine bis zu 80 %ige Repopulation der Leber erzielt werden<sup>44, 45</sup>. Dabei bewahrten die Zellen trotz Kryokonservierung ihre Fähigkeit zur Teilung und Repopulation. Neoplasien traten dabei in keinem der Experimente auf.

Gelänge es, die Proliferation und Differenzierung hepatischer Vorläuferzellen zu Hepatozyten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezielt zu steuern, wären Progenitorzellen neben dem direkten therapeutischen Nutzen auch anderweitig einsetzbar; der pharmakologischen Forschung stünde ein endloser Vorrat funktioneller Hepatozyten für Testmodelle der Hepatotoxizität von Arzneistoffen zur Verfügung<sup>46</sup>. Vektorielle Einschleusung von Genen in Vorläuferzellen und deren Propagation würden Möglichkeiten der Gentherapie zur Korrektur angeborener metabolischer Defekte eröffnen. Nicht zuletzt würde die Grundlagenforschung von Progenitorzellen profitieren, da sie sich zur Ableitung elementarer Kenntnisse über die Natur der Leberentwicklung, der Proliferation und Differenzierung eignen würden<sup>36, 47</sup>.

Galt die Existenz adulter hepatischer Stammzellen lange Zeit als umstritten<sup>48</sup>, so ist man innerhalb der letzten 20 Jahre dank einflussreicher Arbeiten an tierischen Lebern zu der Einsicht gekommen, dass tierische und humane Lebern durchaus ein hepatisches Stammzellkompartiment beherbergen. Jedoch besteht weder eine einhellige Meinung über die phänotypische Identität der Stammzellen noch absolute Klarheit über ihre exakte physiologische Rolle<sup>14, 36</sup>. Ein Blick auf die derzeit bekannte Faktenlage zur hepatischen Regeneration könnte darüber Aufschluss geben.

## 1.2 Die Leberregeneration

Dank umfassender Forschungsarbeit konnte vor allem in den letzten zwei Dekaden ein Erkenntniszuwachs bei den molekularen und biologischen Abläufen der regenerierenden Leber verzeichnet werden<sup>36</sup>. Dies wurde vor allem durch die biotechnologischen Fortschritte in diesem Zeitraum ermöglicht, die dank der Entwicklung transgener Tiere und des DNA-Microarrays eine weiterführende Analyse der Vorgänge auf molekularbiologischer Ebene erlaubte. Nichtsdestotrotz sind die Kenntnisse auf diesem Gebiet gegenwärtig noch rudimentär<sup>7</sup>.

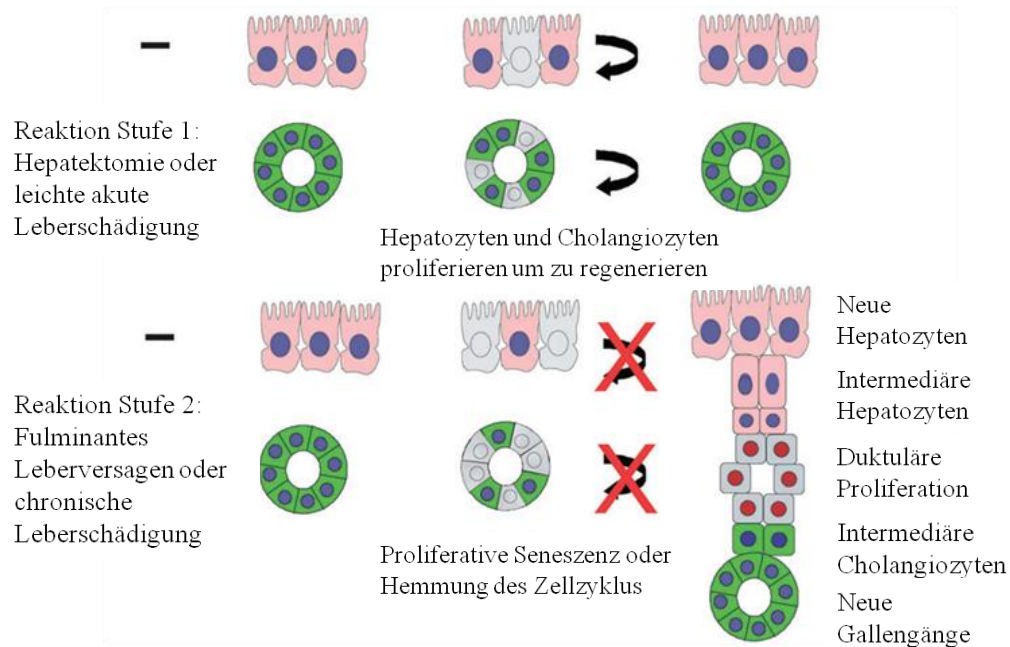
Im Folgenden werden einführend die elementaren Prinzipien der Leberregeneration nach aktuellem Wissensstand beleuchtet.

### 1.2.1 Mechanismen der Regeneration

Bei der Erneuerung des Lebergewebes *in vivo* werden aufgrund fundamentaler Unterschiede drei Situationen differenziert: den gewöhnlichen Zellumsatz der Leber ohne Schädigung, die Reparatur des Gewebes nach akuter, leichter Schädigung (z. B. nach partieller Hepatektomie, Exposition hepatotoxischer Verbindungen) und die Reparatur des Gewebes nach chronischem Einfluss von Noxen (z. B. Speicherkrankheiten, chronische Hepatitiden, Alkoholabusus) sowie nach akuter, schwerer Schädigung<sup>33, 49</sup>.

In den ersten beiden Fällen wird der Zellersatz überwiegend durch die differenzierten hepatischen Zellen (adulte Hepatozyten und Cholangiozyten) gewährleistet, wenngleich mit verschiedener Dynamik<sup>3, 10</sup>. Benötigt ein vollständiger Umsatz des Leberparenchyms unter physiologischen Bedingungen etwa ein Jahr<sup>3</sup>, so sind die Hepatozyten bei akutem Zelluntergang oder Gewebeverlust bis zu zwei Dritteln der gesunden Lebermasse zu dem eingangs beschriebenen Gewebeersatz in der Lage<sup>2</sup>. Dabei handelt es sich nicht um eine *restitutio ad integrum* in engerem Sinne, sondern um eine zeitlich koordinierte kompensatorische Hyperplasie aller Leberzellen mit anschließender Hypertrophie<sup>10, 50</sup>. Dieser Vorgang wird durch das Zusammenspiel einer Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert<sup>2, 10, 51</sup>. Der akute mechanische oder chemisch induzierte Leberzelluntergang führt zusammen mit bakteriellen Produkten und Teilen des Komplementsystems zur Aktivierung der Kupffer'schen Sternzellen (lokal residierende Makrophagen der Leber), die Interleukin-6 (IL-6) und TNF- $\alpha$  exprimieren. IL-6 kann mit anderen Mitogenen wie u. a. HGF<sup>52</sup>, Insulin oder Triiodthyronin an die verbliebenen Hepatozyten andocken und über eine intrazelluläre Signalkaskade den Eintritt der Hepatozyten aus der G<sub>0</sub>-Phase in den Zellzyklus initiieren<sup>7</sup>. Dieser fein modulierte Prozess wird durch den antiproliferativen

TGF- $\beta$  terminiert, der von den hepatischen Stellatzellen vermehrt ausgeschüttet wird, wenn die Ausgangsmasse der Leber erreicht wird<sup>53</sup>. Im Schnitt durchläuft jeder Hepatozyt nach Zweidrittel-Hepatektomie 1,4-mal den Zellzyklus<sup>5, 33</sup>. Dieses einzigartige Charakteristikum des Hepatozyten widerspricht dem allgemeinen Paradigma, eine differenzierte Zelle könne nur in begrenztem Maße proliferieren, und hat ihm das Attribut der unipotenten Stammzelle eingebracht<sup>7</sup>.



**Abbildung 1.3 Zwei-Stufen-Modell der Leberregeneration.** Die Grafik veranschaulicht, nach welchem Muster die Leberregeneration in der humanen Leber in Abhängigkeit von Schwere und Art der Schädigung abläuft. Bei leichter Schädigung und Gewebeverlust durch Hepatektomie erfolgt der Ersatz ausschließlich durch Hepatozyten und Cholangiozyten, deren Teilung durch freiwerdende Zytokine und Wachstumsfaktoren initiiert wird. Lediglich im Falle einer chronischen Leberschädigung oder eines schweren akuten Schadens wird ein fakultatives Stammzellreservoir aktiviert, da hier die Proliferationskapazität der reifen Zellen erschöpft ist. Ausgehend von duktulären Proliferationen im Bereich der Hering-Kanäle werden sowohl Hepatozyten als auch Cholangiozyten über Zwischenstufen generiert. Die intermediären Zelltypen können als hepatische Progenitorzellen aufgefasst werden (modifiziert nach Riehle et al., 2011)<sup>49</sup>.

Chronische Leberschädigungen, massiver Leberzelluntergang oder hepatozelluläre Alterung sind mit einem eingeschränkten Replikationspotential der Hepatozyten assoziiert<sup>33, 49</sup>. Zwecks Gewebersatzes wird hier stattdessen ein fakultatives Zellkompartiment in der Leber aktiviert, das im Normalzustand ruht und Eigenschaften von Stammzellen aufweist<sup>54, 55</sup>. Daraus geht eine Population schnell proliferierender Zellen hervor (*engl. transit amplifying cells*), die entweder zu Hepatozyten oder Cholangiozyten differenziert<sup>56-59</sup>. Beim Nager wird dieser bipotente Zelltyp als Ovalzelle, ihr humanes Äquivalent als hepatische Progenitorzelle (HPC) bezeichnet<sup>60</sup>.



Nachfolgend wird der Begriff HPC nicht explizit für solche Zellen verwendet, die Ovalzellen gleichen, sondern synonym für sämtliche in der Literatur erwähnten humanen Progenitorzellen der Leber gebraucht.

Die Aktivierung des Stammzellkompartiments wird vorrangig durch Entzündungszellen getriggert. Menge und Lokalisation der inflammatorischen Infiltrate korrelieren in chronisch geschädigten Lebern mit denen von Ovalzellen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass ausgeschüttete Zytokine als Wachstums- und chemotaktischer Faktor für HPCs fungieren<sup>61, 62</sup>. Die Kenntnis der beteiligten Zytokine und Signalkaskaden bei der Progenitorzell-vermittelten Leberregeneration könnte zum gezielten Eingreifen in die molekularen Wege verhelfen; auf diese Weise wäre die Modulation von Wachstum und Differenzierung der HPCs *in vivo* und *in vitro* denkbar<sup>63</sup>.

### 1.2.2 Kandidaten für adulte Stamm- und Progenitorzellen der Leber

Die bisherigen Resultate, die vornehmlich auf Untersuchungen am Tier fußen, weisen auf einen heterogenen Phänotyp der Ovalzellen hin. Auch bei den wenigen humanen Studien zur Analyse hepatischer Progenitorzellen zeichnete sich hinsichtlich des Zellcharakters kein einheitlicher Konsens ab<sup>14</sup>. Unklar ist dabei, ob es sich um unterschiedliche Entwicklungsstufen des gleichen Zelltyps oder um gänzlich andere Zellentitäten handelte. Die Interpretation der Ergebnisse wird durch die fehlende Standardisierung der experimentellen Rahmenbedingungen (Tiermodelle, Isolierungs-, Kultivierungs- und Charakterisierungsmethoden) zusätzlich erschwert<sup>13</sup>. Eine wichtige Gemeinsamkeit lässt sich jedoch bei näherer Betrachtung feststellen: Alle beschriebenen Zellpopulationen weisen phänotypische und funktionelle Eigenschaften sowohl von Stammzellen als auch ihrer spezialisierten Nachfolgegeneration, den Hepatozyten und Cholangiozyten, auf. Sie nehmen damit eine intermediäre Position zwischen den genannten Zelltypen ein. Nachfolgend wird ein Überblick über die wichtigsten aktuell bekannten Kandidaten für adulte Stamm- und Progenitorzellen der Säugetierleber geliefert. Es wird jeweils auf die für diese Arbeit relevanten Merkmale der einzelnen Zelltypen eingegangen.

#### 1.2.2.1 Ovalzellen (*engl. oval cells*)

Bei den Ovalzellen handelt sich um den ältesten bekannten und am besten dokumentierten Vorläuferzelltyp. Sie wurden bereits 1956 von Farber als durchschnittlich 10 µm durchmessende Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation und ovalförmigem Nucleus beschrieben<sup>64</sup>.

Das populärste Induktionsmodell für Ovalzellen ist das modifizierte Solt-Farber-Modell; dabei wird den Tieren 2-Acetylaminofluoren (2-AAF), eine antiproliferative Chemikalie, verabreicht und anschließend ein mitogener Stimulus in Form einer Zweidrittel-Hepatektomie gesetzt<sup>33</sup>. Der so simulierte Replikationsblock der Hepatozyten führt zur Ovalzell-Antwort, da diese durch das Fehlen von Cytochrom-P450-Enzymen gegenüber dem 2-AAF resistent sind<sup>56</sup>. Das morphologische Korrelat der Ovalzell-Antwort stellt die sog. dukkuläre Reaktion dar<sup>60</sup>.

Die bipotente Zellpopulation zeichnet sich durch einen hohen Grad an phänotypischer Heterogenität aus; dabei hat neben interspezifischen Unterschieden auch die Art des Modells einen Einfluss auf die Identität<sup>14</sup>. Am häufigsten werden Ovalzellen in der Literatur als positiv für CK19, CK7, CK8, CK18, Albumin und AFP beschrieben<sup>65</sup>. Mehrfach wurden spezifische Marker für Ovalzellen vorgeschlagen<sup>33</sup>, u. a. OV-6. Die absolute Spezifität dieser Antigene hat sich jedoch nicht bestätigt; daher können sie nur im Gesamtkontext betrachtet werden<sup>14</sup>. Das Differenzierungspotential der Ovalzellen wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgreich demonstriert<sup>58, 66, 67</sup>.

#### 1.2.2.2 *Small Hepatocytes*

Einer Arbeitsgruppe um T. Mitaka gelang es, aus unbehandelten Lebern an Ratten<sup>68</sup> und zuletzt auch am Menschen<sup>69</sup> einen hochreplikativen Zelltyp zu isolieren. Da er morphologische, phänotypische und funktionelle Eigenschaften von adulten Hepatozyten aufweist, aber im Schnitt mit 7-10 µm im Durchmesser etwa halb so groß ist, wurde er *Small Hepatocyte* (SH) getauft. Die Besonderheit liegt vor allem darin, dass er selektiv unter serumfreien Kulturbedingungen auf Hyaluronsäure-beschichteten Kulturplatten proliferiert. *Small Hepatocytes* besitzen mit AFP, Albumin, CK18 und CK19 ein ähnliches Expressionsmuster wie Ovalzellen, synthetisieren im Gegensatz dazu jedoch auch spezifische Marker reifer Hepatozyten wie Cytochrom P450-Monooxygenasen, Transferrin und *liver-enriched transcription factors* (LETf) wie z. B. HNF-4α. Ovalzellmarker konnten dabei nicht nachgewiesen werden. Der Zelltyp wird als bipotent beschrieben und als determinierte Progenitorzelle eingestuft<sup>70</sup>. Es stehen mehrere Marker für *Small Hepatocytes* zur Diskussion, unter anderem CD44v6, eine speziell gespleißte Variante des Hyaluronsäurerezeptors<sup>71</sup> und Annexin A3, ein calciumabhängiges Protein, das regulatorisch auf Signaltransduktionswege und Zellwachstum einwirkt<sup>72</sup>.

#### 1.2.2.3 *Humane hepatische Stammzellen (hHpSCs) und Hepatoblasten*

Die Arbeitsgruppe um L.M. Reid definierte zwei Stammzelltypen, die sie aus gesunden menschlichen Lebern unterschiedlichen Alters gewinnen konnten: humane Hepatische Stammzellen (hHpSCs) und Hepatoblasten<sup>73</sup>. Bei hHpSCs handelt es sich um 7-10 µm durchmessende,

koloniebildende Zellen mit geringem Zytoplasmagehalt. Sie ließen sich u. a. durch Immunselektion für EpCAM-positive Zellen anreichern und waren unter serumfreien Kulturbedingungen über sechs Monate zu klonogener Expansion imstande. Die Zellpopulation vervielfachte sich dabei um den Faktor 150 bei einer Zellverdopplungszeit von initial 36 Stunden. Dabei exprimierten sie CK18, CK19, CD44, NCAM, CD133 und waren schwach positiv für Albumin<sup>74</sup>. Als Hauptunterscheidungsmerkmal zu Hepatoblasten ließen sich weder AFP noch Cytochrom-p450-Enzyme nachweisen. Sie werden als Vorläufer von bipotenten Hepatoblasten angesehen, aus denen bei chronischer Leberschädigung wiederum determinierte Stammzellen hervorgehen. Hepatoblasten messen ca. 10-12 µm und erweisen sich *in vitro* als schwieriger haltbar. Die maximale Überlebenszeit von einer Woche auf Plastik lässt sich mittels Kokultivierung mit embryonalen Stromazellen auf zwei Monate strecken. Nach Transplantation von hHpSCs im Mausmodell konnte deren Expansion und Differenzierung zu hepatozytenartigen Zellen gezeigt werden.

#### *1.2.2.4 Adult-derived human liver stem/progenitor cells (ADHLSCs)*

Einen weiteren intrahepatischen Vorläuferzelltyp beschrieb die französische Arbeitsgruppe um E.M. Sokal. Bei den sog. *adult-derived human liver stem/progenitor cells* (ADHLSCs) handelt es sich um nahezu unbegrenzt expandierbare Leberzellvorläufer aus gesunder humaner Leber mit vornehmlich mesenchymalen Eigenschaften<sup>75</sup>. Abgesehen von morphologischen Ähnlichkeiten zu Fibroblasten exprimieren sie auch klassische mesenchymale Marker wie Vimentin, CD90 und *alpha-smooth muscle actin* (ASMA). Ließen sich bei den ADHLSCs bereits in undifferenziertem Zustand einige hepatozelluläre Marker (Albumin, CYP3A4, HNF-4α) nachweisen, so ist es mittlerweile möglich, die Progenitorzellen *in vitro* zu hepatozytenartigen Zellen heranreifen zu lassen, die leberspezifische metabolische Funktionen wie Gluconeogenese, Ammoniakentgiftung und Biotransformation erfüllen können<sup>76</sup>. Da sich das Differenzierungs- und Implantationspotential des Zelltyps im Mausmodell bestätigt hat, ist hier von einem aussichtsreichen Kandidaten für eine zukünftige klinische Anwendung auszugehen.

#### *1.2.2.5 Weitere intra- und extrahepatische Stammzellen*

Neben einer überschaubaren Anzahl von Veröffentlichungen über andere potentielle humane Leberzellvorläufer aus adulten und fetalen Lebern<sup>77-80</sup>, setzen sich mehrere Quellen mit Stammzelltypen extrahepatischer Gewebe auseinander, denen die Eignung zur Produktion intakter Hepatozyten nachgesagt wird. Der nachgewiesene positive Effekt von Transplantationen hämatopoetischer Stammzellen auf die hepatische Funktion leberinsuffizienter Tiere konnte auf Zellfusionsereignisse zurückgeführt werden<sup>81, 82</sup>. Deren Beitrag zur Leberregeneration ist in

physiologischer Leber vernachlässigbar gering<sup>83</sup>. Als weitaus vielversprechender erweisen sich mesenchymale Stammzellen (MSCs) des Knochenmarks<sup>33, 84</sup>; es konnte im Tiermodell die Implantation der MSCs in der geschädigten Leber und deren Differenzierung zu Hepatozyten gezeigt werden<sup>85</sup>. Einzelne Erfolge konnten ferner unter klinisch-experimentellen Bedingungen verzeichnet werden<sup>86</sup>. Des Weiteren war es möglich, durch Transdifferenzierung mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe hepatozyten-ähnliche Zellen *in vitro* und *in vivo* zu generieren<sup>87, 88</sup>. Kritisch zu bewerten ist jedoch die profibrotische Wirkung auf die Leber, die bei mesenchymalen Stammzellen vermutet wird<sup>89</sup>. Eine junge und zukunftssträchtige Entwicklung stellt die Herstellung sog. induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS) dar<sup>90, 91</sup>. Dabei wurden zunächst reife Fibroblasten, später auch weitere Zelltypen, durch vektorielle Einschleusung spezifischer Gensequenzen mit Integration in das Genom auf einen weniger differenzierten Zustand reprogrammiert. Die neu wiedererlangte Pluripotenz könnte mittels geeigneter Protokolle zur umfangreichen Erzeugung diverser Gewebetypen genutzt werden<sup>7</sup>. Systematische Untersuchungen zu ihrer Kanzerogenität und der Sicherheit des retroviralen Transfers stehen noch aus<sup>15</sup>. Schließlich ist es einer Forschergruppe kürzlich gelungen, murine Fibroblasten durch Gentransfer direkt zu weitestgehend funktionsfähigen Hepatozyten zu transdifferenzieren<sup>92</sup>. Bisherige Transplantationsversuche im Mausmodell der Tyrosinämie Typ I deuteten auf ein erhebliches Repopulationspotential von derartig erzeugten Hepatozyten mit signifikanter Verbesserung der hepatischen Funktion hin. Dabei traten keinerlei Entartungen auf. Diese Resultate stimmen für eine Übertragung der Methodik auf menschliche Fibroblasten zwecks kurativen Einsatzes überaus optimistisch.

### 1.2.3 Debatte zur Stammzellnische

Bei einer Stammzellnische handelt es sich um eine räumlich definierte Umgebung, in der die adulten Stammzellen in den jeweiligen Organen angesiedelt sind. Ihr Zweck ist die Aufrechterhaltung eines Milieus, das optimal für Überleben und Funktion der Stammzellen ist<sup>93</sup>. Dies wird durch zelluläre und humorale Komponenten bewerkstelligt. In mehreren Organen wie Knochenmark<sup>94</sup>, Gehirn<sup>95</sup>, Haut<sup>96</sup> und in den intestinalen Krypten<sup>97</sup> wurden solche Nischen bereits nachgewiesen.

In Analogie zum Knochenmark wurde in der Vergangenheit häufig versucht, eine solche Stammzellnische auch in der Leber zu lokalisieren. Nach Beobachtungen an Ovalzellen in Nagern und kürzlich auch an hepatischen Progenitorzellen des Menschen ist die derzeit gängigste

Sichtweise, dass sich das Stammzellkompartiment der Leber im Bereich der sog. Hering-Kanälchen befindet<sup>33, 57, 98</sup>. Dabei handelt es sich um die kleinsten intrahepatischen Äste der Gallenwege, die die *Canaliculi biliferi* mit den *Ductuli interlobulares biliferi* verbinden. Damit lägen sie in unmittelbarer Nähe zum periportalen Feld mit der Glisson'schen Trias. Dieser Ansatz findet Unterstützung in der sog. Theorie der *streaming liver*, nach der in der Leber ein gerichteter Zellumsatz vom periportalen Feld nach zentrilobulär erfolgt<sup>99, 100</sup>. Es sei angemerkt, dass einige Autoren dieses Konzept als widerlegt auffassen<sup>101</sup>. Sporadisch wurden weitere Ursprungsnischen für die Zellerneuerung favorisiert, z. B. intralobuläre Gallenwege, periduktale Zellen und peribiliäre Hepatozyten<sup>102, 103</sup>.

Die Kenntnis und die Erforschung einer hepatischen Stammzellnische könnte für die *in vitro* Kultivierung etwaiger Stammzellen hilfreich sein; so wäre es vorstellbar, durch die Herbeiführung von Kulturbedingungen, die der Nische nachempfunden sind, Stamm- und Progenitorzellen über lange Zeit in undifferenziertem Zustand zu halten und gezielt zu expandieren<sup>104</sup>.

### 1.3 Isolierung und Kultivierung adulter Stammzellen

Das lückenhafte Wissen über die Leberregeneration, insbesondere über die Progenitorzellvermittelte Form, ist nicht zuletzt der Tatsache geschuldet, dass Vorläuferzellen der Leber schwer zu akquirieren sind<sup>14</sup>. Dies wird einerseits mit der vermutlich geringen Zahl an aktivierten Stammzellen in physiologischer Leber begründet, andererseits mit einer verbesserungswürdigen und uneinheitlichen Methodik für Extraktion und Anzucht der Zellen<sup>105</sup>. Im folgenden Abschnitt werden die gängigen Techniken zur Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung hepatischer Stamm- und Progenitorzellen herausgearbeitet. Des Weiteren werden die Hauptprobleme, die sich daraus ergeben, aufgezeigt.

#### 1.3.1 Isolierung

Die Herauslösung der Zellen aus ihrem Verband erfolgt in der Regel durch enzymatische Zerstörung des Zell-Zell- und Zell-Matrix-Netzwerkes<sup>14</sup>; mittels Perfusion mit Kollagenase oder Pronase wird im Tiermodell *in situ*, beim Menschen an gesunden Resektaten eine Zellsuspension gewonnen, die ein Zellgemisch aller in der Leber vertretenen Zelltypen darstellt (zu 80 % Hepatozyten, zu 20 % Stammzellen, Kupffer-Zellen, Stellatzellen, Endothelzellen, Lymphozyten, Erythrozyten<sup>2</sup>). Dem wird häufig ein Fraktionierungsschritt unterschiedlicher Art angeschlossen,

der der Anreicherung der Stammzellfraktion dienen soll. Dabei werden diverse spezifische Parameter der HPCs genutzt: Größe, Dichte, Antigenexpression und Funktion der Zellen sind hilfreich, um sie von den übrigen Komponenten abzutrennen<sup>14</sup>. Wurden in den Anfangsjahren noch mehrstufige Zentrifugationprotokolle bei niedriger Rotationsfrequenz verwendet, wurde dies zunehmend durch den Gebrauch von Dichtegradienten (z. B. Percoll®) abgelöst. Vor dem Hintergrund, dass Progenitorzellen durchweg eine geringe Größe und Dichte beigemessen wird, lassen sich so Zellpopulationen umschriebener Dichte aus der Suspension filtern. Nichtsdestotrotz bleibt die gewonnene Zellfraktion stets heterogen.

Andere Autoren reinigen die Suspension noch gezielter auf, indem sie mittels spezifischer Antikörperbindung Zellen mit ausgewähltem Antigenprofil herausselektieren (Immunselektion)<sup>106</sup>. Zu den populärsten Techniken gehören das sog. *fluorescence activated cell sorting* (FACS) und das *magnetic activated cell sorting* (MACS)<sup>7</sup>. Die Anwendung der eleganten und praktischen Verfahren wird durch den schlecht definierten Immunphänotyp von Progenitorzellen und den Mangel an spezifischen Markern für Progenitorzellen erschwert<sup>104</sup>. So wurde bei den bisherigen Versuchen näherungsweise die Existenz von häufigen Markern (z. B. CD133, EpCAM) postuliert, ohne dass dies der Vielfalt an dargestellten Phänotypen in der Literatur gerecht wird<sup>107-109</sup>.

### 1.3.2 Kultivierung

Zu den Grundprinzipien bei der Kultivierung von Stammzellen *in vitro* zählen die Simulation der Mikroumgebung in der Stammzellnische<sup>104</sup> und – zwecks Differenzierung – die Imitation der molekularen Mechanismen bei der Organentwicklung<sup>7, 46, 110</sup>. Es werden hierzu lösliche Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und weitere Mitogene (Insulin, Selen, Hydrokortison) eingesetzt, ebenso wie konditionierte Medien, Matrizes und spezielle Beschichtungen der Kulturgefäße. Mittels Kokultur mit mesenchymalen Ammenzellen (sog. Feederzellen) können über parakrine Signale und Zell-Zell-Interaktionen das Überleben und die Expansion der Stammzellen verbessert werden<sup>111</sup>. Es steht derzeit für die verschiedensten Stammzellen eine Vielzahl von entsprechenden Kultivierungsprotokollen zur Verfügung. Dabei wird die Kontrolle über Proliferation und Differenzierung der Zellen angestrebt<sup>46</sup>.

Für die Haltung hepatischer Stamm- und Progenitorzellen sind die Kulturbedingungen so wenig standardisiert wie ausgereift<sup>13</sup>. Die Lebensspanne hepatischer Vorläuferzellen ist *in vitro* begrenzt. Die meisten in der Literatur beschriebenen Nährmedien teilen trotz verschiedener Zusammensetzungen eine Eigenschaft: Sie enthalten fetales Kälberserum<sup>69</sup>. Dieses enthält undefinierte

Substrate, die für das Leben und Wachstum der Stammzellen essentiell sind. Dem Gebrauch wird jedoch gemeinhin mit Skepsis begegnet, da mit der Verwendung tierischer Proteine die Angst vor Zoonosen, Prionenerkrankungen und hoher Antigenität bei späterem klinischem Einsatz verbunden ist. Nur punktuell gelang es bisher, HPCs serumfrei anzuzüchten<sup>69, 73</sup>.

Mit der Wahl der Beschichtung kann unter Umständen bereits eine Selektion hinsichtlich des Zelltyps, der an die Matrixkomponente bindet, erzielt werden (*plastic adherence technique*)<sup>104</sup>. Wird z. B. statt dem am häufigsten benutzten Kollagen Hyaluronsäure verwendet, so adhären nur solche Zellen, die auch den Hyaluronsäurerezeptor (CD44, mutmaßlicher Progenitorzellmarker<sup>71, 98, 112</sup>) exprimieren.

Die Propagation toti- und pluripotenter Stammzellen und die Lenkung der Differenzierung *in vitro* ist ein aufwändiger Prozess; so ließen sich erst jüngst Zellen mit hepatozytärem Charakter generieren (*hepatocyte-like cells*), ohne funktionell vollwertig zu sein<sup>7</sup>. Adulte hepatische Vorläufer zeigten hingegen meist eine hohe intrinsische Proliferationskapazität und konnten bereits *in vitro* aktiv zu reifen Hepatozyten und Cholangiozyten differenziert werden. Dennoch gestaltet sich die Anzucht von HPCs als äußerst komplex und erweist sich aufgrund wechselnder Ausgangs- und Versuchsbedingungen als schlecht reproduzierbar<sup>105</sup>. Es bedarf weiterer Optimierung und Normierung der Zellkultur.

### 1.3.3 Charakterisierung

Üblicherweise erfolgt die Charakterisierung von HPCs auf vier Ebenen: auf morphologischer, RNA-, Protein- und funktioneller Ebene<sup>104</sup>.

Die Morphologie wird mit Hilfe von Phasenkontrastmikroskopie und ultrastrukturellen Aufnahmen beurteilt. Dabei wird auf Form und Größe der Zellen sowie deren Nuclei, auf die Kern-Plasma-Relation, Polarität und hepatozytentypische Auffälligkeiten (Glykogeneinschlüsse, ausgeprägtes rauhes und glattes endoplasmatisches Retikulum) geachtet.

Der Phänotyp wird darüber hinaus mittels RT-PCR oder Microarray-Chip auf Transkriptionsebene und anhand von Immunfärbungen auf Proteinebene ermittelt. Für eine vollständige Proteomik reicht die Menge des Zellmaterials häufig nicht aus<sup>104</sup>. Es wird in der Regel auf die Expression von Stammzellmarkern (z. B. CD133, EpCAM, NCAM, AFP), spezifischen Leberzellmarkern (z. B. Albumin, Transferrin, Connexin 32, Cytochrom-p450-Enzyme), spezifischen biliären Markern (CK7, CK19), vermeintlichen Progenitorzellmarkern (z. B. CD44v6, OV-6) und von weiteren epithelialen und mesenchymalen Antigenen zwecks Bestätigung oder Ausschlusses

getestet. Daneben sei darauf hingewiesen, dass häufig eine zeitliche Dynamik in der Antigenexpression vorhanden ist, die eine differenzierte Betrachtung der Ergebnisse erfordert.

Eine funktionelle Charakterisierung beinhaltet zum Einen die Beobachtung der zellulären Replikation *in vitro*<sup>104</sup>. Dies kann durch kontinuierliche Kolonie- und Zellzählungen oder mittels quantitativer Proliferationstests erfolgen. Zum Anderen kann der Differenzierungsgrad der Zellen überprüft werden, indem sie auf spezifische hepatozelluläre Funktionen wie Albuminsekretion, Ammoniakabbau, Gluconeogenese und Detoxifikation von Substraten über das Cytochrom-p450-System untersucht werden. Der ultimative Beweis für das Vorliegen funktionsfähiger Progenitorzellen wäre die *in vivo*-Transplantation mit Nachweis der hepatischen Besiedlung und Reifung zu adulten Hepatozyten und Cholangiozyten, beispielsweise durch Labeling-Studien. Hierfür wird in der Regel ein selektiver Wachstumsvorteil der transplantierten Donorzellen durch genetische Modifikation, Bestrahlung oder chemische Schädigung der Wirtsleber geschaffen<sup>7</sup>.

### 1.3.4 Limitationen

Ein augenscheinliches Kernproblem liegt in der fehlenden Standardisierung der Verfahren zur Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung von hepatischen Stamm- und Progenitorzellen<sup>13</sup>. Damit wird die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Resultate stark eingeschränkt.

Um eine für Industrie und Klinik relevante Zahl von hepatischen Vorläufern zu gewinnen, bedarf es einer Optimierung der Methodik auf jeder Stufe. Die Isolierung muss insofern verbessert werden, dass Stamm- und Progenitorzellen möglichst in Reinkultur angezchtet werden können. Dies lässt sich mit einer einheitlichen Definition des Antigenprofils oder der Ermittlung zellspezifischer Marker verwirklichen<sup>36</sup>, da nur so der sinnvolle Einsatz von immunselektiven Verfahren ermöglicht wird. Damit ist eine präzise Charakterisierung der Vorläuferzellen auf lange Sicht entscheidend<sup>104</sup>.

Für die anspruchsvolle Kultivierung der Vorläufer sind Anpassungen der Kulturbedingungen zwingend notwendig; aktuell ist die Steuerbarkeit von Wachstum und Differenzierung hepatischer Progenitorzellen unzureichend<sup>104</sup>. Des Weiteren stellt die Verwendung tierischer Proteine, insbesondere in Form von fetalem Kälberserum, bei der Anzucht eine Hürde für spätere therapeutische Zwecke dar<sup>69</sup>.

Ein weiteres fundamentales Problem ist die begrenzte Anzahl an Untersuchungen, die an menschlichen Lebern durchgeführt worden ist. So ist unklar, ob die tierexperimentellen Daten zu



Gewinnung, Phänotypen und Regenerationspotential der Vorläuferzellen überhaupt auf humane Progenitorzellen extrapolierbar sind<sup>46</sup>. Die Ursache für diesen Mangel ist erneut in der Knappheit an gesunden Leberproben zu suchen. Ferner ist anzunehmen, dass die Menge hepatischer Stammzellen in nicht geschädigter Leber verschwindend gering ist. Es stellt sich daher die Frage: Wie lässt sich der Anteil hepatischer Vorläuferzellen in der humanen Leber erhöhen?

#### **1.4 Zirrhotische Leber als Reservoir für adulte Stammzellen**

Die Gründe für den Sachverhalt, dass Studien über humane Leberstammzellen in der Literatur unterrepräsentiert sind, liegen auf der Hand; menschliches Lebergewebe für Forschungszwecke ist rar. Darüber hinaus werden in den Tierexperimenten Aktivierung und Proliferation der Vorläuferzellen durch vorsätzliche Schädigung der Lebern und Exposition gegenüber z.T. kanzerogenen Chemikalien (2-AAF, Retrorsin, Dipin u. a.) induziert<sup>7, 105</sup>. Dieses Vorgehen verbietet sich aus offensichtlichen ethischen Gründen beim Menschen. Es stellt sich daher die Frage, ob eine Gewinnung von Stammzellen der menschlichen Leber überhaupt realisierbar ist, zumal die Existenz von Vorläufern in physiologischer Leber strittig ist<sup>113</sup>. Die Lösung könnte die erkrankte Leber selbst liefern.

Als gemeinsame pathophysiologische Endstrecke vieler Lebererkrankungen liegt eine Leberzirrhose bei Indikationsstellung zur Lebertransplantation im Großteil der Fälle vor<sup>1, 8</sup>. Dabei kommt es aufgrund der chronischen Exposition von Noxen neben parenchymalen Nekrosen zu einer Stimulation des lokalen Immunsystems (Kupffer'sche Sternzellen), die eine chronische Entzündung auslöst und Reparationsvorgänge einleitet<sup>61, 114</sup>. Bei der wiederholten Schädigung werden Stellatzellen aktiviert, die zu Myofibroblasten transformieren. Ferner machen Hepatozyten und Cholangiozyten eine Wandlung durch, die als epitheliale-mesenchymale Transition bezeichnet wird. Mit zunehmendem Krankheitsprogress sezernieren sie zusammen mit portalen Fibroblasten und den proliferierenden Myofibroblasten interstitielle Kollagene<sup>33, 115</sup>. Die fortschreitende Fibrose zerstört die hepatische Histoarchitektur und schränkt durch Erhöhung des Perfusionswiderstandes die Leberfunktion weiter ein<sup>1</sup>. Während der Fibrogenese wird zeitgleich die Leberregeneration angeregt, die aber aufgrund der strukturellen Reorganisation unzureichend ist. Makroskopisch ist die Leber mit zahlreichen Regeneratknoten durchsetzt, die pathognomonisch sind<sup>1, 47</sup>.

Mit der Aktivierung der Regeneration durch das Immunsystem und der eingeschränkten Teilungsfähigkeit der reifen Hepatozyten durch oxidativen Stress<sup>54</sup> lassen sich Parallelen zur Induktion von Progenitorzellen am Nager ziehen<sup>51</sup>. Somit könnte man die Leberzirrhose als humanes Pendant zum Tierexperiment auffassen. Untermuert wird dies dadurch, dass bei diversen chronischen Lebererkrankungen des Menschen (primäre biliäre Zirrhose, chronisch virale Hepatitis, nicht-alkoholische Steatohepatitis) HPCs nachgewiesen werden konnten<sup>116-118</sup>. Ferner korreliert die Ovalzell-Antwort mit der Schwere des Schadens<sup>55</sup> und dem Ausmaß der Fibrose<sup>119</sup>. Es ist daher nicht auszuschließen, dass ein gewöhnlich als minderwertig erachtetes Gewebe wie die ethanol-induzierte zirrhatische Leber, das regelmäßig bei Transplantationen anfällt, eine wertvolle Anreicherung hepatischer Stammzellen darstellt, die es gilt, aus ihrem pathologischen Zellverband zu lösen und ihr eigentliches Potential entfalten zu lassen.

## 2. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Die Regeneration der Leber nach Schädigung folgt nach aktuellem Wissensstand einem Zwei-Stufen-Modell<sup>49</sup>. Während nach akuter und leichter Leberschädigung der Gewebeersatz durch differenzierte Zelltypen der Leber (Hepatozyten und Cholangiozyten) gewährleistet wird, sind bei chronischer und schwerer Leberschädigung primär hepatische Stamm- und Progenitorzellen dafür verantwortlich. Eine gezielte Isolierung und Anzucht solcher hepatischer Vorläuferzellen könnte Wege für neue kurative Therapien zur Behandlung von Leberpathologien ebnen, bei denen als *ultima ratio* bisher nur die orthotope Lebertransplantation in Frage kam. Derartige Versuche wurden bislang fast ausschließlich an tierischen Lebern durchgeführt; die limitierte Datenlage beim Menschen ist vornehmlich auf die Knappheit humaner Lebern zu Forschungszwecken zurückzuführen. Weitere Hindernisse stellt derzeitig der uneinheitlich definierte Immunphänotyp der Vorläuferzellen, die mangelhafte Kontrolle über Wachstum, Differenzierung und Überleben der Zellen *in vitro* und die Kultivierung mit Nährmedien, die tierisches Serum beinhalten, dar. Darüber hinaus sind die im Tiermodell etablierten Modelle zur Induktion einer Stammzellproliferation aus ethischen Gründen nicht auf den Menschen übertragbar. Jedoch lassen Untersuchungen an humanen zirrhotischen Lebern unterschiedlicher Ätiologie eine Korrelation zwischen Schwere des chronischen Schadens und proliferativer Antwort der Vorläuferzellen vermuten.

Die zu beweisende Hypothese dieser Arbeit besteht darin, dass humane zirrhotische Lebern ethyltoxischer Genese ein Reservoir humaner Stamm- oder Progenitorzellen stellen, die leicht zu isolieren, serumfrei kultivierbar und expandierbar sind.

Damit werden konkret folgende Ziele definiert:

- Gewinnung hepatischer Stamm- oder Progenitorzellen aus adultem humanen Lebergewebe - sowohl gesund als auch chronisch geschädigt
- Evaluation des Isolierungsverfahrens in Bezug auf die Kolonieausbeute
- Versuch der serumfreien Kultivierung und Expansion
- Charakterisierung der isolierten Stamm- oder Progenitorzellen
- Vergleich der Zellpopulation mit bisher beschriebenen humanen Vorläuferzellen der Leber

Die gewonnenen Erkenntnisse sollen der Beantwortung folgender Fragen dienen:

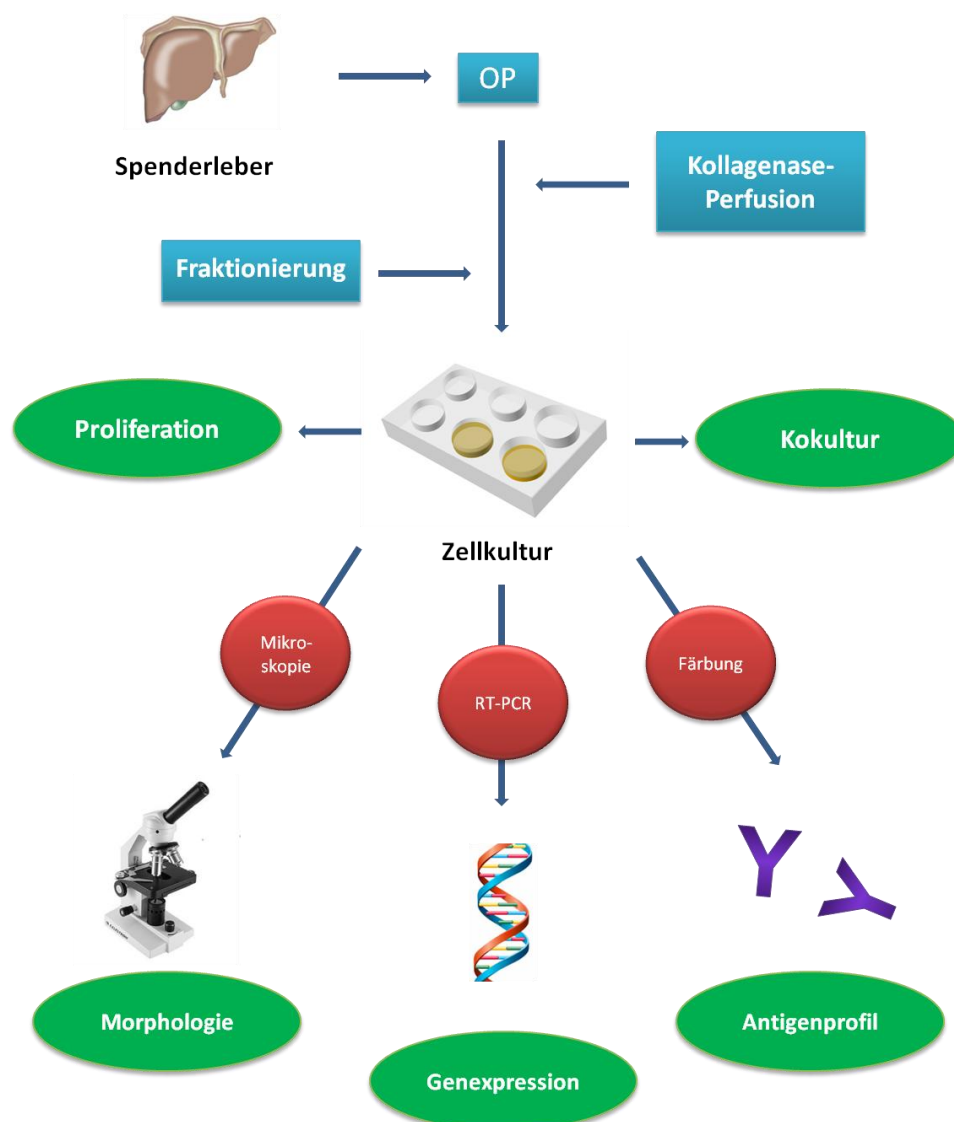
1. Lassen sich hepatische Progenitorzellen mittels standardisierter Verfahren wie dem Kollagenase-Perfusionsverdau und der Dichtegradientenzentrifugation aus gesundem und/oder zirrhotischem Lebergewebe isolieren?
2. Liefern zirrhotische Lebern ethyltoxischer Genese mehr Vorläuferzellen als gesunde Proben?
3. Gelingt eine serumfreie Zellkultur der Progenitorzellen? Wie lang überleben die Zellen? Differenzieren sie *in vitro*?
4. Wie ausgeprägt ist das Proliferationspotential der Zellen? Lassen sie sich gezielt expandieren?
5. Lässt sich ein spezifischer Marker oder ein Markerprofil ableiten, anhand dessen eine zielgerichtete Anreicherung mit immunselektiven Verfahren ermöglicht wird? Bestätigt das Profil den Vorläuferzellcharakter?
6. Kann man hepatischen Vorläuferzellen eine anatomische Lokalisation *in vivo* zuordnen?
7. Eignet sich die gewonnene Zellmenge für eine etwaige Zelltherapie oder andere kurative Ansätze?

### 3. Material und Methoden

In diesem Kapitel wird zunächst eine schematische Übersicht über den gesamten Projektablauf geliefert. Anschließend wird im Einzelnen auf die dabei verwendeten Materialien und Methoden eingegangen.

#### 3.1 Umriss des Projektablaufes

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, hepatische Progenitorzellen aus adulten Leberresektaten zu gewinnen, serumfrei anzuzüchten und zu charakterisieren. Dabei wurden im Wesentlichen zwei verschiedene Spendergruppen als Ressource herangezogen: Patienten mit vorhandener Leberzirrhose und solche mit unbeschädigten Gewebeanteilen.



**Abbildung 3.1** Übersichtsschema der Projektstruktur. Das Flussdiagramm stellt die grundlegenden Eckpfeiler des Projektes dar. RT-PCR: Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.

Nach einem standardisierten Isolierungsverfahren wurden zur Anreicherung der Vorläuferzellen zwei Fraktionierungsmethoden mit unterschiedlichen Parametern ausgetestet und hinsichtlich ihrer Kolonieausbeute verglichen. Die effizienteste Technik wurde identifiziert und weitergeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte sowohl unter serumfreien als auch teilweise serumfreien Bedingungen; die beobachteten Kolonien wurden in Hinblick auf ihr Wachstum und ihr Überleben in der Zellkultur engmaschig überwacht. Zusätzlich wurde die Propagation statischer Kolonien durch Kokultur mit fibroblastischen Ammenzellen erprobt.

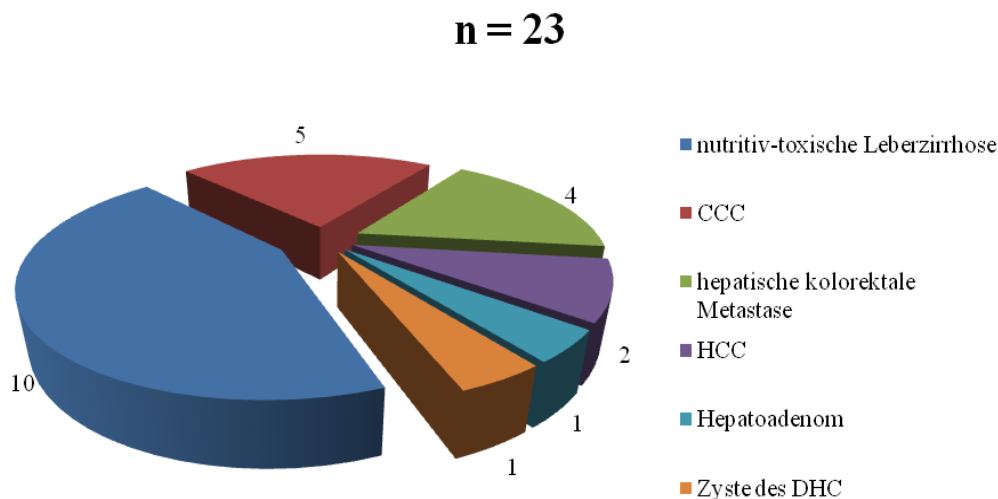
Die Charakterisierung des koloniebildenden Zelltyps erfolgte auf verschiedenen Ebenen. Zur Beurteilung der Zellmorphologie wurden die Kolonien lichtmikroskopisch dokumentiert. Auf molekularbiologischer Ebene wurde die Expression ausgewählter Gene über RT-PCRs bestimmt. Ergänzt wurde der Phänotyp durch eine Reihe von Immunfluoreszenzfärbungen, die das Antigenprofil der Zellen vervollständigen sollten.

### **3.2 Fein- und Biochemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien wurden nur p. a. rein verwendet.

### **3.3 Leberteileresektate**

Das Spendermaterial für die vorliegenden Untersuchungen wurde zwischen Februar 2008 und Januar 2009 im Rahmen von 23 viszeralchirurgischen Eingriffen in der Klinik für Allgemein-, Visceral- und Transplantationschirurgie Charité Campus Virchow-Klinikum Berlin gewonnen; dies geschah nach informierter Einwilligung der Patienten und unter Zustimmung der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Hierunter fielen 13 adulte nicht-zirrhatische und 10 adulte zirrhatische Leberteileresektate von Patienten verschiedener Altersstufen (Tabelle 3.1). Während das Ursachenspektrum bei den Nicht-Zirrhatikern diverse Entitäten umfasste, lag den zirrhatischen Lebern eine ausnahmslos nutritiv-toxische Genese zugrunde (Abb. 3.2). Eine virale Ätiologie der Zirrhosen war präoperativ ausgeschlossen worden.



**Abbildung 3.2 Diagnosespektrum der Spenderlebern.** Die Grunddiagnosen werden farbkodiert als Anteil am gesamten Untersuchungsgut wiedergegeben. n: Gesamtzahl der Spender; CCC: cholangiozelluläres Karzinom; HCC: hepatozelluläres Karzinom; DHC: Ductus hepatocholedochus.

Nach chirurgischer Resektion sive Explantation wurden dem makroskopisch gesunden oder zirrhotischen Gewebe durchschnittlich  $46,3 \pm 4,7$  g (arithmetisches Mittel  $\pm$  SEM) wiegende Proben entnommen. Dabei wurde auf die weitestgehende Unversehrtheit der Leberkapsel als wichtige Voraussetzung für die Perfusionsisolierung geachtet. Des Weiteren wurde bei Vorliegen von intrahepatischen soliden Raumforderungen bei Probengewinn ein Mindestabstand von vier Zentimetern eingehalten. Die Präparate wurden unter Aufrechterhaltung der Kühlkette ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in Hepatozyten-Inkubationsmedium (siehe Abschnitt 4.3.1) überführt und unmittelbar weiter prozessiert.

**Tabelle 3.1 Aufschlüsselung der Spenderdaten anhand der gewonnenen Leberproben.** Die Proben sind in chronologischer Reihenfolge der durchgeführten Isolierungen aufgelistet. ID: Kennungsnummer.

Proben-ID	Spenderalter	Geschlecht	Diagnose	Probengewicht (g)
1	72	♂	Hepatozelluläres Karzinom	14
2	71	♀	Cholangiozelluläres Karzinom	38
3	22	♂	Hepatoadenom	34
4	68	♀	Cholangiozelluläres Karzinom	56
5	47	♂	Hepatozelluläres Karzinom	46
6	24	♂	Hepatische kolorektale Metastase	22
7	78	♀	Hepatische kolorektale Metastase	51
8	54	♀	Leberzirrhose	42
9	19	♀	Choledochuszyste	35
10	47	♂	Cholangiozelluläres Karzinom	10
11	66	♂	Hepatische kolorektale Metastase	31
12	55	♂	Leberzirrhose	75
13	68	♂	Cholangiozelluläres Karzinom	48

**Tabelle 3.1 (Fortsetzung) Aufschlüsselung der Spenderdaten anhand der gewonnenen Leberproben.**

Proben-ID	Spenderalter	Geschlecht	Diagnose	Probengewicht [g]
14	60	♂	Leberzirrhose	35
15	59	♂	Hepatische kolorektale Metastase	29
16	57	♂	Leberzirrhose	46
17	65	♂	Leberzirrhose	76
18	64	♂	Leberzirrhose	77
19	58	♀	Leberzirrhose	31
20	62	♂	Leberzirrhose	69
21	56	♀	Leberzirrhose	103
22	49	♂	Leberzirrhose	37
23	55	♀	Cholangiozelluläres Karzinom	61

### 3.4 Kulturmedien

Alle verwendeten Kulturmedien wurden nach Ansatz steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Sie wurden maximal eine Woche lang verwendet. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden sie im Wasserbad (Typ 1013, GFL, Burgwedel, D) zehn Minuten lang auf 37 °C erwärmt.

#### 3.4.1 Hepatozyten-Inkubationsmedium

Als Nährlösung für das native Lebergewebe und die Zellsuspension kam während des Isolierungsprozesses und der späteren Zellkultur ein spezielles Hepatozyten-Inkubationsmedium zum Einsatz (Tab. 3.2). Es werde fortan als *William's medium E* (WME-Medium) bezeichnet.

**Tabelle 3.2 Zusammensetzung des Hepatozyten-Inkubationsmediums.** \* Vor Verwendung bei 56 °C zehn Minuten lang inaktiviert. DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; IE: Internationale Einheit.

Reagenz	Konzentration	Hersteller
DMEM	-	PAA, Pasching, A
Fetales Kälberserum (FCS)*	10 %	PAA, Pasching, A
HEPES	15 mM	Roth, Karlsruhe, D
Natriumpyruvat	1 mM	Invitrogen, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	100 U/100 µmol/L	Invitrogen, Karlsruhe, D
Insuman Rapid 40 IE/ml (Humaninsulin)	1 mM	Sanofi-Aventis, Berlin, D
Fortecortin Inject 4 mg/ml (Dexamethason)	0,8 µg/ml	Merck, Darmstadt, D



### 3.4.2 Mitaka-Medium

Die Isolate wurden in einer speziellen serumfreien Nährlösung kultiviert (Tabelle 3.3). Es werde nachfolgend nach seinem Erstbeschreiber T. Mitaka als Mitaka-Medium bezeichnet<sup>69</sup>.

**Tabelle 3.3** Zusammensetzung des serumfreien Nährmediums. DMEM/F12: *Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12*; HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure.

Reagenz	Konzentration	Hersteller
DMEM/F12	-	Biochrom, Berlin, D
HEPES	20 mM	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	25 mM	Merck, Darmstadt, D
L-Prolin	30 mg/L	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	0,1 %	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Nicotinamid	10 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ascorbinsäure-2-phosphat	1 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dexamethason	10 <sup>-7</sup> M	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS)-Zusatz	1 %	Becton Dickinson, Bedford, MA
Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human	10 µg/L	PeptoTech, London, UK
Hepatozyten Wachstumsfaktor (HGF), human	20 µg/L	PeptoTech, London, UK
Penicillin/Streptomycin	100 U/100 µmol/L	Invitrogen, Karlsruhe, D

### 3.4.3 Inkubationsmedium der Feederzellen

Für die Kultivierung der humanen Vorhautfibroblasten in Rein- und Kokultur wurde ein weiteres Inkubationsmedium verwendet (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4** Zusammensetzung des Inkubationsmediums für die humanen Vorhautfibroblasten.

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's medium	-	PAA, Pasching, A
Fetales Kälberserum (FCS)	10 %	PAA, Pasching, A
Penicillin/Streptomycin	1 %	Invitrogen, Karlsruhe, D
Nicht-essentielle Aminosäuren	1 %	Invitrogen, Karlsruhe, D

## 3.5 Isolierung der primären Zellsuspension

### 3.5.1 Reagenzien und Geräte

#### 3.5.1.1 Perfusionslösung I:

**Tabelle 3.5** **Zusammensetzung der Perfusionslösung I.** Beide Ausführungen der Lösung wurden nach Ansatz steril filtriert und für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. \* Nach Ansatz wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 adjustiert. † Zugabe erst kurz vor Gebrauch. HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; EGTA: Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure.

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	142 mM	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	6,7 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
HEPES	10 mM	Roth, Karlsruhe, D
Aqua dest.	-	Fresenius Kabi, Louviers, F
<i>ohne EGTA*</i>		
Humanalbumin†	0,5 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>mit EGTA</i>		
EGTA	2,4 M	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

#### 3.5.1.2 Perfusionslösung II:

**Tabelle 3.6** **Zusammensetzung der Perfusionslösung II.** Die Lösung wurde nach Ansatz auf einen pH-Wert von 7,6 adjustiert, steril filtriert und für maximal vier Wochen bei 4 °C gelagert. \* Zugabe unmittelbar vor Gebrauch. † pro Gramm Probengewicht wurden der Lösung 4 mg Kollagenase hinzugefügt.

Reagenz	Konzentration	Hersteller
Natriumchlorid (NaCl)	67 mM	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	6,7 mM	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	4,8 mM	Merck, Darmstadt, D
Aqua dest.	-	Fresenius Kabi, Louviers, F
HEPES	100 mM	Roth, Karlsruhe, D
Humanalbumin	0,5 % (v/v)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kollagenase P*	probenabhängig†	Roche, Mannheim, D

### 3.5.1.3 Weitere Materialien

**Tabelle 3.7** Materialien für die Hepatozytenisolierung aus Leberresektaten. PBS: Phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung.

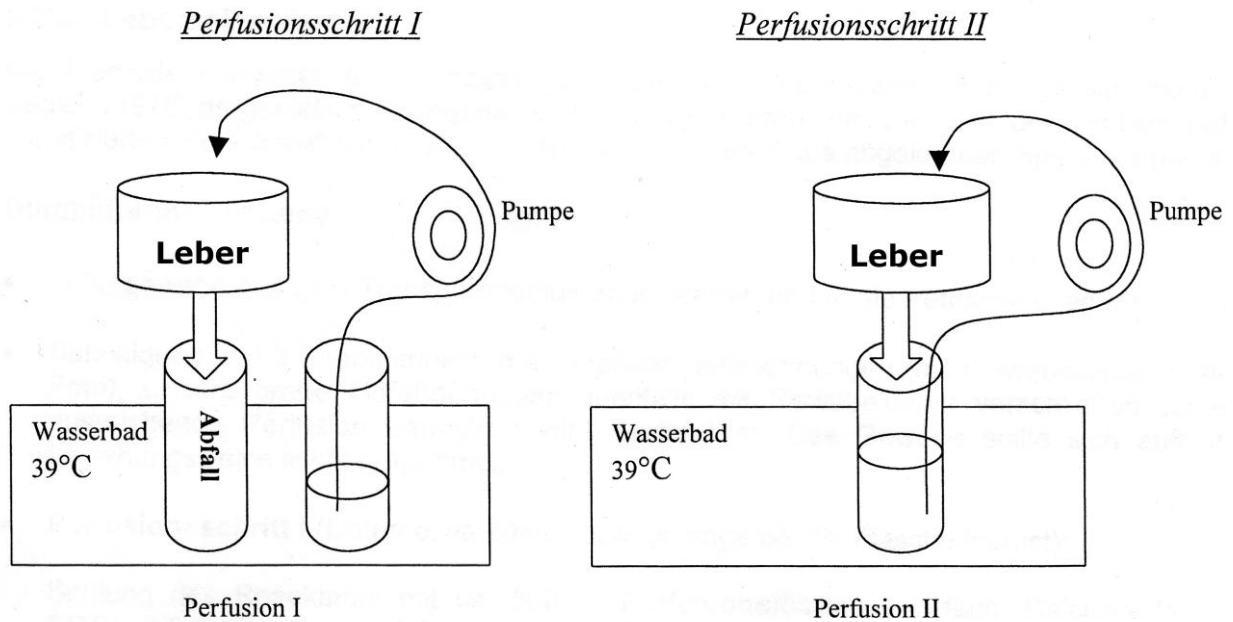
Gerät/Reagenz	Hersteller
3-Wege-Kanüle (steril)	Eigenproduktion
Buchner Sieb (steril)	Roth, Karlsruhe, D
Tauchsieder mit Thermostat	Roth, Karlsruhe, D
Wasserbad	VWR, Darmstadt, D
Peristaltikpumpe	Roth, Karlsruhe, D
Silikonschläuche (steril)	Roth, Karlsruhe, D
Histoacryl <sup>®</sup> 5 x 0,5 ml	Aesculap, Tuttlingen, D
Zentrifuge (Varifuge 3.0R)	Heraeus, Hanau, D
Dulbecco´s PBS (1x)	PAA, Pasching, A
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Zählkammer	Laboroptik, Bad Homburg, D
Lichtmikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss, Göttingen, D

### 3.5.2 Kollagenase-Perfusionstechnik

Die Isolierung der primären Zellsuspension basierte auf einem von Dorko et al. beschriebenen Zwei-Schritt-Verfahren zur Hepatozytenisolierung aus Leberresektaten mittels Kollagenase-Perfusion<sup>120</sup>. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Nach transportbedingter kalter Ischämiezeit von maximal zehn Minuten wurde das intraoperativ gewonnene Lebermaterial der Versuchsvorrichtung zugeführt; zentraler Bestandteil war hier ein mit Tauchsieder und Thermostat aufgeheiztes Wasserbad (39 °C). Im ersten Schritt wurden drei Knopfkanülen in den größten Gefäßlumina des Resektats fixiert und weitere Öffnungen mittels Gewebekleber okkludiert. Anschließend wurde das Leberstück 20 Minuten lang mit Hilfe eines angeschlossenen Schlauch-Peristaltikpumpen-Systems von der angewärmten Perfusionslösung I mit EGTA durchspült (Durchflussrate 25 ml/min).

Im zweiten Schritt wurde die Versuchsvorrichtung so arrangiert, dass das Leberresektat in einem geschlossenen Kreislauf von Perfusionslösung II reperfundiert werden konnte (Abb. 3.3). Nach Zugabe der Kollagenase zirkulierte Perfusionslösung II 15 bis 25 Minuten lang mit einem Flow von 25 ml/min zwischen Auffangbehälter und Leberprobe; Endpunkt für diesen Schritt war die irreversible Verformbarkeit des Gewebes durch leichten manuellen Druck oder die Zeitüber-



**Abbildung 3.3** Skizze des Versuchsaufbaus beim Kollagenase-Verdau. Angedeutet sind die jeweiligen Anordnungen der Apparatur bei den beiden Perfusionsschritten der Isolierungstechnik.

schreitung. Der verbliebene Geweberest wurde in eine Petrischale mit Perfusionslösung I ohne EGTA gelegt und mit einem Skalpell sorgfältig zerkleinert. Danach wurde die isolierte Zellsuspension über sterile Kompressen in mehrere Spitzbodenröhrchen filtriert und auf Eis gestellt. Abschließend erfolgte die Zentrifugation bei 50 g über fünf Minuten und die Resuspension der Pellets in WME-Medium.

Den Röhrchen wurden definierte Mengen an Suspension entnommen und mit Trypanblau durchmischt. Mittels lichtmikroskopischer Auszählung der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Anzahl vitaler Zellen in Lösung abgeschätzt. Die Vitalität der Zellsuspension definierte sich dabei wie folgt:

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Vitale Zellzahl} \times 100}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

## 3.6 Fraktionierungen

### 3.6.1 Dichtegradienten

Bei der Dichtegradientenzentrifugation wurden fünf verschiedene Gradienten verwendet (Tab. 3.8). Dazu wurden zunächst unterschiedliche Verdünnungen aus Percoll<sup>®</sup>-Stammlösung (Dichte: 1.124 g/ml, Sigma-Aldrich, Steinheim, D) mit PBS hergestellt (70 %, 55 %, 45 %, 42 %, 40 %, 30 %, 25 %, 15 %). Anschließend erfolgte unter Kühlung die vorsichtige Schichtung der Verdünnungen in 50 ml fassenden Zentrifugationsröhrchen.

**Tabelle 3.8**      **Zusammensetzung der Gradienten.** Es sind jeweils die Verdünnungen der genutzten Percoll<sup>®</sup>-Lösung und die eingesetzten Volumina in den entsprechenden Phasen dargestellt. Die Schichtung begann immer basal mit der höchsten Konzentration der Percoll<sup>®</sup>-Lösung.

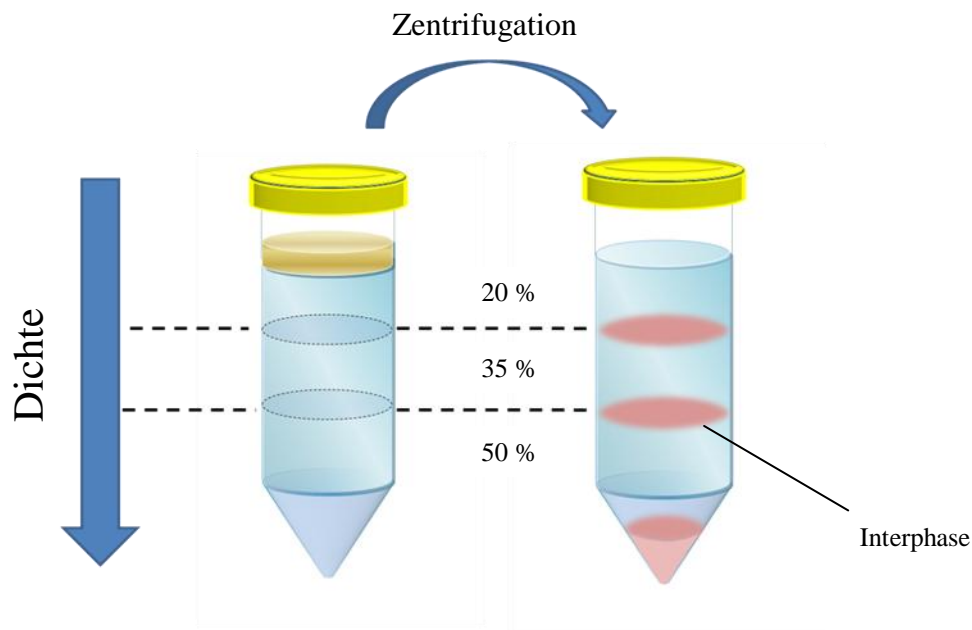
Gradient	1. Phase	Volumen	2. Phase	Volumen	3.Phase	Volumen
A	25 %	13 ml	40 %	13 ml	55 %	13 ml
B	20 %	13 ml	35 %	13 ml	50 %	13 ml
C	15 %	20 ml	30 %	20 ml	-	-
D	42 %	20 ml	70 %	20 ml	-	-
K-Gradient	30 %	20 ml	45 %	20 ml	-	-

### 3.6.2 Dichtegradientenzentrifugation nach Knobloch

Zur Anreicherung der mutmaßlichen hepatischen Progenitorzellen aus den Isolaten wurde ein Protokoll zur Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt, das von D. Knobloch et al. auf Grundlage von nicht publizierten Pilotversuchen entwickelt worden war.

Die isolierten Zellsuspensionen wurden nach Auszählung der vitalen Zellen mit WME-Medium auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro Milliliter verdünnt und jeweils sechs Milliliter Zellsuspension (entsprechen  $12 \times 10^6$  vitalen Zellen) auf einen Gradienten aufgetragen. Dabei wurden je nach Ertrag an vitalen Zellen aus den Isolierungen nur so viele Röhrchen verwendet, dass jeder Gradient möglichst gleichwertig vertreten war. In zwei Fällen (Proben-IDs 3 und 8) wurden aufgrund geringerer Zellausbeute weniger Zellen aufgetragen. Daraufhin erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation ohne Bremse bei 1000 Umdrehungen pro Minute bei 4 °C. Die bei korrekter Ausführung sichtbaren Zellschichten in den Interphasen wurden im Anschluss in separate Tubes überführt, diese mit PBS aufgefüllt und bei 50 g fünf Minuten lang bei 4° C zentrifugiert.

Schließlich wurde nach Wiederholung des Waschvorgangs das Pellet in WME-Medium resuspendiert und eine Zellzählung durchgeführt.



**Abbildung 3.4 Dichtegradientenzentrifugation nach Knobloch.** Exemplarisch wurde die Aufsichtung des Gradienten B skizziert. Nach Auftragung der isolierten Zellsuspension auf den Gradienten mit anschließender Zentrifugation für 20 Minuten bei 1000 rpm ohne Bremse wurden die einzelnen Interphasen gesammelt und kultiviert; sie galten als Fraktionen, die potentiell mit HPCs angereichert waren. Das Pellet wurde nicht berücksichtigt.

Nach acht Isolierungen erfolgte eine Evaluation der Gradienten und des Mitaka-Protokolls hinsichtlich ihrer späteren Kolonieausbeute; in der Folge wurde nur noch die effizienteste Fraktionierungsmethode für die Versuche berücksichtigt.

### 3.6.3 Separation nach dem Mitaka-Protokoll

Ein Teil der isolierten Zellen wurde nach dem von Mitaka et al. beschriebenen Protokoll zur Selektion von *Small Hepatocytes* aus adulter Rattenleber behandelt<sup>68</sup>. Hierbei handelte es sich um ein mehrschrittiges Zentrifugationsverfahren bei geringen Rotationsgeschwindigkeiten. Es wurde die gleiche Menge an vitalen Zellen eingesetzt, die auch auf die einzelnen Gradienten aufgetragen wurde.

## 3.7 Kultivierung

### 3.7.1 Beschichtungen der Mikrotiterplatten

Die Mikrotiterplatten wurden vor Gebrauch unter sterilen Auflagen mit Kollagen oder Hyaluronsäure beschichtet.

Dabei wurde Rattenschwanzkollagen (Eigenproduktion, Mischkollagen) in 1 %iger Lösung auf die Wells aufgetragen und die Platten 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt und die Platten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Des Weiteren wurden Wells einiger Platten mit 100 µg Hyaluronsäure (Curasan, Kleinostheim, D) pro cm<sup>2</sup> beschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur steril aufbewahrt. Am Folgetag wurde die Hyaluronsäurelösung abgesaugt. Die Lagerung der Platten erfolgte bis zum Gebrauch bei 4 °C.

### 3.7.2 Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden auf Mikrotiterplatten in einem Inkubator (CB 150, Binder, Tuttlingen, D) bei 37 °C und konstantem CO<sub>2</sub>-Luftanteil von 5 % bebrütet.

Bei der Anzucht der Zellen kamen zwei verschiedene Kultivierungsregimes zum Tragen: die partiell serumfreie und die vollständig serumfreie Kultivierung der isolierten Zellsuspensionen. Bei den Versuchen 1 bis 8 erfolgte die Kultivierung ausschließlich partiell serumfrei, ab Isolierungsnr. 9 wurden die Isolate sowohl partiell als auch vollständig serumfrei kultiviert.

Bei der partiell serumfreien Anzucht wurden die vitalen Zellen nach Isolierung und Fraktionierung in WME-Medium gelöst, auf die Multi-Well-Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das WME-Medium abgesaugt und durch das serumfreie Mitaka-Medium (siehe Abschnitt 3.4.2) ersetzt. Über einen Kulturzeitraum von mindestens 30 Tagen wurde jeden zweiten Tag ein Medienwechsel durchgeführt.

Die komplett serumfreie Kultivierung beinhaltete das direkte Lösen der vitalen Zellen in Mitaka-Medium mit anschließender Aussaat und Haltung bei 37 °C. Analog zu den vorangegangenen Ausführungen erfolgte alle zwei Tage ein Austausch des Mediums über ein Zeitintervall von 30 Tagen.

### 3.7.3 Aussaat und Beobachtung

Die Isolate wurden nach Fraktionierung und Zellzählung mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  vitalen Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf beschichtete 6- und 12-Well-Platten ausgesät. In der ersten Woche nach dem Ausplattieren der Zellen wurden die Wells täglich, in der Folgezeit alle zwei Tage von zwei Untersuchern unabhängig voneinander lichtmikroskopisch (Axiovert 135, Axiovert 200M; Carl Zeiss, Göttingen, D) auf das Auftreten von Kolonien überprüft; als Kolonie wurde ein Konglomerat von mindestens zehn morphologisch gleichartigen Zellen definiert. Die Platten wurden dabei in 100-facher Vergrößerung abgesucht. Neben der Koloniezahl wurde die Morphologie der koloniebildenden Einheiten fotografisch dokumentiert. Mehrfach wurden Zeitrafferaufnahmen einzelner Kolonien über Nacht angefertigt (Axiovert 135, Kamera).

### 3.7.4 Passage auf einen Feeder-Layer

Es wurde mehrfach der Versuch unternommen, Kolonien aus nicht-zirrhatischen und zirrhatischen Lebern auf Ammenzellen zu übertragen und in Kokultur anzuzüchten.

#### 3.7.4.1 Humane Vorhautfibroblasten

Als Feederzellen dienten humane Vorhautfibroblasten (HFF-1, ATCC, Manassas, VA), die gemäß Protokoll des Herstellers aufgetaut, propagiert und bei Konfluenz der Zellen mittels Mitomycin C (Sigma-Aldrich, Steinheim, D) inaktiviert wurden. Es wurde das in Abschnitt 3.4.3 beschriebene Inkubationsmedium für Feederzellen als Nährlösung verwendet. Die Zellen wurden nach Inaktivierung mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf Mikrotiterplatten ausgesät.

#### 3.7.4.2 Manuelle Mikrodissektion

Für die Übertragung wurden aus praktischen Gründen größere Kolonien ausgewählt. Mit Hilfe eines filigranen Schnittwerkzeuges (Stem Cell Cutting Tool) wurden die einzelnen Kolonien unter aseptischen Bedingungen von der Beschichtung gelöst, aspiriert und auf die Wells mit den Feederzellen überführt. Nachfolgend wurden die Platten im Inkubator bebrütet und täglich auf Adhärenz und Proliferation der Kolonien kontrolliert. Ein Wechsel des Feederzellen-Mediums wurde täglich durchgeführt.



## 3.8 RT-PCR

### 3.8.1 Geräte und Chemikalien

**Tabelle 3.9** Auflistung der Geräte, Chemikalien und Kits für die RT-PCR.

Gerät/Chemikalie/Kit	Hersteller
Stem Cell Cutting Tool	Vitrolife, Kungsbacka, S
TRIzol <sup>®</sup> -Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA XS Kit	Macherey-Nagel, Düren, D
extremescript-OLS <sup>®</sup> -Kit	OMNI Life Science, Bremen, D
Mikrozentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Thermocycler PTC-200	MJ Research, Watertown, MA
NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, Dreieich, D
DEPC	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Magnesiumchlorid	Invitrogen, Karlsruhe, D
dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe, D
Taq DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
Chloroform	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
100-Baasenpaarleiter	GE, Buckinghamshire, UK
Elektrophoresekammer	Roth, Karlsruhe, D
UV-Platte GeneFlash	Syngene, Cambridge, UK

### 3.8.2 Primer

Die spezifischen Oligonukleotid-Primer wurden samt Basensequenz und PCR-Protokoll nach eingehender Recherche in der Literatur und der NCBI-Datenbank ausgewählt und mit Hilfe der Software Vector NTI virtuell auf das Fehlen von Schleifen und Dimeren getestet. Es wurden nur solche Primer berücksichtigt, deren PCR-Produkt eine Länge von 100-400 Basenpaaren und einen GC-Gehalt von ungefähr 50 % aufwies. Zudem sollten deren Annealingtemperaturen etwa bei 5 °C unter der niedrigeren Schmelztemperatur der Primerpaare liegen.

Die Herstellung der Primer für Annexin A3, Connexin 32 und EpCAM erfolgte durch die Firma TIB MOLBIOL (Berlin, D). Die übrigen Primer stammten von der Firma Interactiva (Ulm, D). Nach Anlieferung der Primer wurden die entsprechenden PCR-Protokolle etabliert.

**Tabelle 3.10** Auflistung der verwendeten Primer für die PCR. AFP: Alpha-1-Fetoprotein; CK18: Zytokeratin 18; CYP1A2/3A4: Cytochrom P450 Typ 1A2/3A4; EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*; S: Sense-Primer; AS: Antisense-Primer; bp: Basenpaare; T<sub>a</sub>: Annealingtemperatur; N: Anzahl der PCR-Zyklen.

Gen	Primer	Sequenz	Produktlänge [bp]	T <sub>a</sub> [°C]	N
AFP	S	5' tga aat gac tcc agt aaa ccc 3'	199	58	40
	AS	5' aat gag aaa ctc ttg ctt cat c 3'			
Albumin	S	5' tga gaa aac gcc agt aag tga c 3'	265	58	29
	AS	5' tgc gaa atc atc cat aac agc 3'			
Annexin A3	S	5' tga agg gta ttg gaa ctg atg 3'	254	60	30
	AS	5' tga gaa gaa gta agg tgg agc 3'			
β-Actin	S	5' acc cac act gtg ccc atc ta 3'	289	58	30
	AS	5' cgg aac cgc tca ttg cc 3'			
CK18	S	5' aga aat ctg aag gcc agc ttg gag 3'	372	56	37
	AS	5' tac cct gct tct gct ggc tta atg 3'			
Connexin 32	S	5' acc aat tct tcc cca tct cc 3'	132	56	37
	AS	5' cct caa gcc gta gca ttt tc 3'			
CYP1A2	S	5' caa tca ggt ggt ggt gtc ag 3'	280	55	40
	AS	5' gtc ccg gac act gtt ctt gt 3'			
CYP3A4	S	5' ttg gaa gtg gac cca gaa ac 3'	265	55	40
	AS	5' ctg gtg ttc tca ggc aca ga 3'			
EpCAM	S	5' ctg gcc gta aac tgc ttt gt 3'	182	60	30
	AS	5' agc cca tca ttg ttc tgg ag 3'			
Transferrin	S	5' gga agc cgg tag atg aat aca ag 3'	171	60	32
	AS	5' tga gga gag ctg aat agt tgg aa 3'			

### 3.8.3 Manuelle Mikrodisektion

Zur Gewinnung von reiner Gesamt-RNA aus den koloniebildenden Einheiten wurden Kolonien aus zirrhotischem und nicht-zirrhotischem Spendermaterial gezielt durch manuelle Mikrodisektion gepickt. Dabei wurden möglichst große, homogene Kolonien zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat ausgewählt. Das aspirierte Zellmaterial wurde anschließend in einem RNase-freien Mikrozentrifugationsröhrchen gesammelt.

### 3.8.4 RNA-Extraktion

In Abhängigkeit von der Menge des gewonnenen Zellmaterials wurden zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den Kolonien zwei verschiedene Verfahren angewandt; die RNA aus Kolonien nicht-zirrhotoscher Lebern wurde mittels NucleoSpin<sup>®</sup> RNA XS-Kit extrahiert. Die ihm zugrunde liegende Methode beruht auf dem Prinzip der Silicamembran-Adsorption via Spinsäulen-Technologie. Die Ausführung erfolgte gemäß des vom Hersteller mitgelieferten Isolationsprotokolls unter Zuhilfenahme der beigelegten Reagenzien.

Die Gesamt-RNA aus Kolonien zirrhotoscher Lebern wurde mit Hilfe der sog. TRIzol<sup>®</sup>-Methode gewonnen. Sie basiert auf dem Prinzip der Phenol/Chloroform-Extraktion<sup>121</sup>. Die Isolation erfolgte nach dem zugehörigen Protokoll der Firma Invitrogen.

Der Reinheitsgrad und die Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurden bei beiden Techniken spektrophotometrisch überprüft; das Extinktionspektrum der gewonnenen Lösung wurde mittels Nanodrop ermittelt. Ausschlaggebend für die Weiterverwendung der jeweiligen total RNA war neben einer für RNA typisch konfigurierten Extinktionskurve eine  $A_{260/280}$ -Ratio von mindestens 2,0.

### 3.8.5 Reverse Transkription

Die Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit Hilfe einer Reversen Transkription generiert. Die cDNA-Synthese aus der extrahierten Gesamt-RNA erfolgte mit dem extremescrypt-OLS<sup>®</sup>-Protokoll. Dabei wurden Oligo-(dT)-Primer verwendet. Pro Reaktionsansatz wurden maximal 50 ng an Gesamt-RNA eingesetzt. Der Ansatz der Proben erfolgte auf Eis, die Reaktion wurde im Thermocycler durchgeführt.

### 3.8.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die transkribierte cDNA wurde im Anschluss in die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Mit Hilfe spezifischer Primerpaare (Tabelle 3.10) wurden ausgewählte Genprodukte amplifiziert. Darunter fielen neben dem Housekeeping-Gen  $\beta$ -Actin die Marker CK18, AFP, Annexin A3, EpCAM, Connexin 32, Albumin, CYP3A4, CYP3A1 und Transferrin. Für die Analysen wurden jeweils 100 ng cDNA je Ansatz verwendet. Parallel liefen zum Vergleich und als Positivkontrollen Reaktionsansätze mit cDNA anderer Zelltypen mit; diese waren zuvor aus den entsprechenden Materialien isoliert worden. Es handelte sich dabei um cDNA aus gesunden

adulten Hepatozyten und aus den Tumorzelllinien Hep3B und AKN-1. Als Negativkontrolle dienten Ansätze mit reinem DEPC-Wasser als Analyt.

Der Ansatz der Proben erfolgte permanent auf Eis und wurde gemäß etablierter Pipettierschemata durchgeführt (Tabellen 3.11 und 3.12). Die Reaktionen liefen im Thermocycler nach primer-spezifischen Programmen ab (Tabellen 3.13 bis 3.16).

**Tabelle 3.11 Pipettierschema und Konzentrationsangaben für einen 20 µl-Ansatz bei der PCR.** Es wurden jeweils 100 ng cDNA als Matrize eingesetzt. Das Schema wurde für die Primer von  $\beta$ -Actin, CK18, Connexin 32, EpCAM und Annexin A3 verwendet.

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Volumen
Matrize (cDNA)	50 ng/µl	5 ng/µl	2,0 µl
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Puffer	10-fach	1-fach	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2,5 mM	1,0 µl
dNTPs	10 mM	0,5 mM	1,0 µl
Primer Sense	5 µM	0,25 µM	1,0 µl
Primer Antisense	5 µM	0,25 µM	1,0 µl
Taq. Polymerase	500 U	7,5 U	0,3 µl
DEPC-Wasser	-	-	11,7 µl

**Tabelle 3.12 Pipettierschema und Konzentrationsangaben für einen 20 µl-Ansatz bei der PCR.** Es wurden jeweils 100 ng cDNA als Matrize eingesetzt. Das Schema wurde für die Primer von Albumin, AFP, CYP1A2 und CYP3A4 verwendet. Bei Transferrin wurde das Magnesiumchlorid anders konzentriert: \* 2 mM; † 0,8 µl; ‡ 13,4 µl.

	Konzentration der Stammlösung	Konzentration im Ansatz	Volumen
Matrize (cDNA)	50 ng/µl	5 ng/µl	2,0 µl
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Puffer	10-fach	1-fach	2,0 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1 mM*	0,4 µl†
dNTPs	10 mM	0,25 mM	0,5 µl
Primer Sense	5 µM	0,125 µM	0,5 µl
Primer Antisense	5 µM	0,125 µM	0,5 µl
Taq. Polymerase	500 U	7,5 U	0,3 µl
DEPC-Wasser	-	-	13,8 µl‡

### 3.8.6.1 Programme

**Tabelle 3.13** PCR-Programm des Thermocyclers für die Amplifikation von AFP und CYP1A2.

X: Primer-spezifische Annealingtemperatur, siehe Tabelle 3.10.

	Temp.		Dauer [s]
	[°C]	Zyklen	
Heizstart	94	1	120
Denaturierung	94		60
Annealing	X	40	60
Elongation	72		60
Finale Elongation	72	1	600

**Tabelle 3.14** PCR-Programm des Thermocyclers für die Amplifikation von  $\beta$ -Actin, Albumin, Annexin A3, EpCAM und Transferrin.

X: Primer-spezifische Annealingtemperatur, N: Primerabhängige Anzahl der Zyklen, siehe Tabelle 3.10.

	Temp.		Dauer [s]
	[°C]	Zyklen	
Heizstart	94	1	180
Denaturierung	94		60
Annealing	X	N	60
Elongation	72		120
Finale Elongation	72	1	600

**Tabelle 3.15** PCR-Programm des Thermocyclers für die Amplifikation von CK18 und Connexin 32.

	Temp.		Dauer [s]
	[°C]	Zyklen	
Heizstart	94	1	180
Denaturierung	94		30
Annealing	56	37	30
Elongation	72		30
Finale Elongation	72	1	600

**Tabelle 3.16** PCR-Programm des Thermocyclers für die Amplifikation von CYP3A4.

	Temp.		Dauer [s]
	[°C]	Zyklen	
Heizstart	94	1	180
Denaturierung	94		30
Annealing	55	40	30
Elongation	72		60
Finale Elongation	72	1	420

### 3.8.6.2 Gelelektrophorese

Die amplifizierte DNA-Fragmente wurden auf 1 %igen Agarosegelen in TBE-Puffer mit 40  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Vor dem Beladen des Gels wurde den Proben Bromphenolblau als Ladepuffer beigemischt. Neben den Analyten liefen bei der Elektrophorese mehrere Basenpaarleiter mit. Nach Beendigung des Laufvorgangs wurden die Gele auf eine UV-Platte gelegt und fotografiert.

## 3.9 Immunfluoreszenzfärbungen

### 3.9.1 Geräte und Chemikalien

**Tabelle 3.17** Auflistung der Geräte und Chemikalien für die Immunfluoreszenzfärbungen. DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol; PBS: Phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung.

Gerät/Chemikalie	Hersteller
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Göttingen, D
DAPI	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Aqua dest.	Fresenius Kabi, Louviers, F
Zitronensäure	Merck, Darmstadt, D
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, A
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, A
Methanol	Roth, Karlsruhe, D
Paraffin	Merck, Darmstadt, D
Xylol	Roth, Karlsruhe, D
Schnellkochtopf	Eigengebrauch
Aqua-Poly/Mount	Polysciences, Warrington, PA

### 3.9.2 Histologische Schnitte

Für eine immunhistochemische Färbung wurden Gewebeschnitte aus zirrhotischem Lebermaterial angefertigt. Dabei wurde ein 1 x 1 x 0,5cm großes Resektat zunächst mit Formalin fixiert und mit Ethanol entwässert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurde der Paraffinblock in 2 µm dünne Scheiben geschnitten und auf mehrere Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Präparate bei Raumtemperatur getrocknet.

### 3.9.3 Antikörper

**Tabelle 3.18** Auflistung der verwendeten Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbungen. CD: *cluster of differentiation*; CK: *cytokeratin*; EpCAM: *epithelial cell adhesion molecule*; HNF-4 $\alpha$ : *hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$* ; NCAM: *neural cell adhesion molecule*. \* fluoresziert rot. † fluoresziert grün. ‡ Immunhistochemie.

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller
<i>Primär</i>			
Anti-Annexin A3 (polyklonal)	Kaninchen	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Anti-CD44v6 (monoklonal)	Maus	1:20/300‡	Bender MedSystems, Wien, A
Anti-CD90 (monoklonal)	Maus	1:50	Neomarkers, Fremont, CA
Anti-CD133 (polyklonal)	Kaninchen	1:200	Novus Biologicals, Littleton, CO
Anti-CK18 (monoklonal)	Maus	1:20	Zytomed Systems, Berlin, D
Anti-CK19 (monoklonal)	Maus	1:100	BioGenex, Fremont, CA
Anti-EpCAM (monoklonal)	Maus	1:100	Calbiochem, Bad Soden, D
Anti-HNF-4 $\alpha$ (polyklonal)	Kaninchen	1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
Anti-NCAM (polyklonal)	Kaninchen	1:100	Chemicon, Billerica, MA
Anti-OV-6 (monoklonal)	Maus	1:100	R&D Systems, Minneapolis, MN
Anti-Vimentin (polyklonal)	Kaninchen	1:50	Santa Cruz, Santa Cruz, CA
<i>Sekundär</i>			
Anti-Kaninchen (Alexa Fluor 594*)	Ziege	1:1000	Invitrogen, Paisley, UK
Anti-Maus (Alexa Fluor 488†)	Ziege	1:1000	Invitrogen, Paisley, UK

### 3.9.4 Färbeprotokolle

#### 3.9.4.1 Färbung der Kolonien in der Zellkultur

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurde der koloniebildende Zelltyp aus zirrhatischen und nicht-zirrhatischen Lebern auf speziellen 24-Well-Mikrotiterplatten angezüchtet. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Aussaat wurden die Kolonien fixiert und mit ausgewählten Markern angefärbt (Tab. 3.18). Anschließend wurden sie mit dem Axiovert 200M nativ und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet sowie fotografisch festgehalten.

**Arbeitsablauf:**

- (1) **Fixierung:** Absaugen des Mediums, Waschschrift mit PBS und zehnmünütige Inkubation mit 4 %igem Formalin bei Raumtemperatur. Waschschrift mit PBS, Auftragen von vorgekühltem 80 %igem Methanol und 20 Minuten bei -20 °C lagern. Danach Methanol verwerfen und PBS auftragen.
- (2) **Blockieren:** Blockierungspuffer ansetzen (2-3 % BSA, 0,2 % Fischgelatine und 2 % FCS in PBS gelöst) und auftragen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- (3) **Primärantikörper:** Mischen und abzentrifugieren, Verdünnung in Blockierungspuffer (Tabelle 3.18), Puffer im Well absaugen und 200 µl des Antikörpers auftragen, Inkubation in der Färbe-kammer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend dreifacher Waschschrift mit PBS.
- (4) **Sekundärantikörper:** Anwendung wie oben.
- (5) **DAPI:** Verdünnung von DAPI (1:10 000) in PBS; Auftragen und 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. Abschließend Waschschrift mit PBS.
- (6) **Eindeckeln:** Auftragen von einem Tropfen Aqua-Poly/Mount-Lösung auf den Objektträger, Deckglas auf das Well legen, Luftblasen wegdrücken und trocknen lassen.

### 3.9.4.2 Färbung der Gewebeschnitte

Die Schnitte aus zirrhötischem Gewebe wurden hinsichtlich ihrer Antigenexpression von CD133 und CD44v6 untersucht. Dazu wurden die Präparate zunächst entparaffinisiert, die Antigene demaskiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte mit dem Axiovert 200M nativ und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet und fotografisch dokumentiert.

**Arbeitsablauf:**

- (1) **Entparaffinisierung:** Inkubation mit Xylol, zweimal fünf Minuten lang.
- (2) **Rehydrierung:** Behandlung in absteigender Alkoholreihe, jeweils zwei Minuten lang in Ethanol (100 %→96 %→80 %→70 %), danach Spülung mit Aqua dest.
- (3) **Demaskierung:** Ansatz des Citratpuffers (10 mM, pH = 6,0), Kochen der Schnitte mit Citratpuffer im Schnellkochtopf bei maximalem Druck über 12 Minuten, dann 30 Minuten lang abkühlen lassen.
- (4) **Blockieren:** Blockierungspuffer ansetzen (2-3 % BSA, 0,2 % Fischgelatine und 2 % FCS in PBS gelöst) und auftragen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
- (5) **Färbung:** analog zu Abschnitt 3.9.4.1 Schritte (3) bis (6).



### 3.10 Software

**Tabelle 3.19**                      **Auflistung der verwendeten Software.**

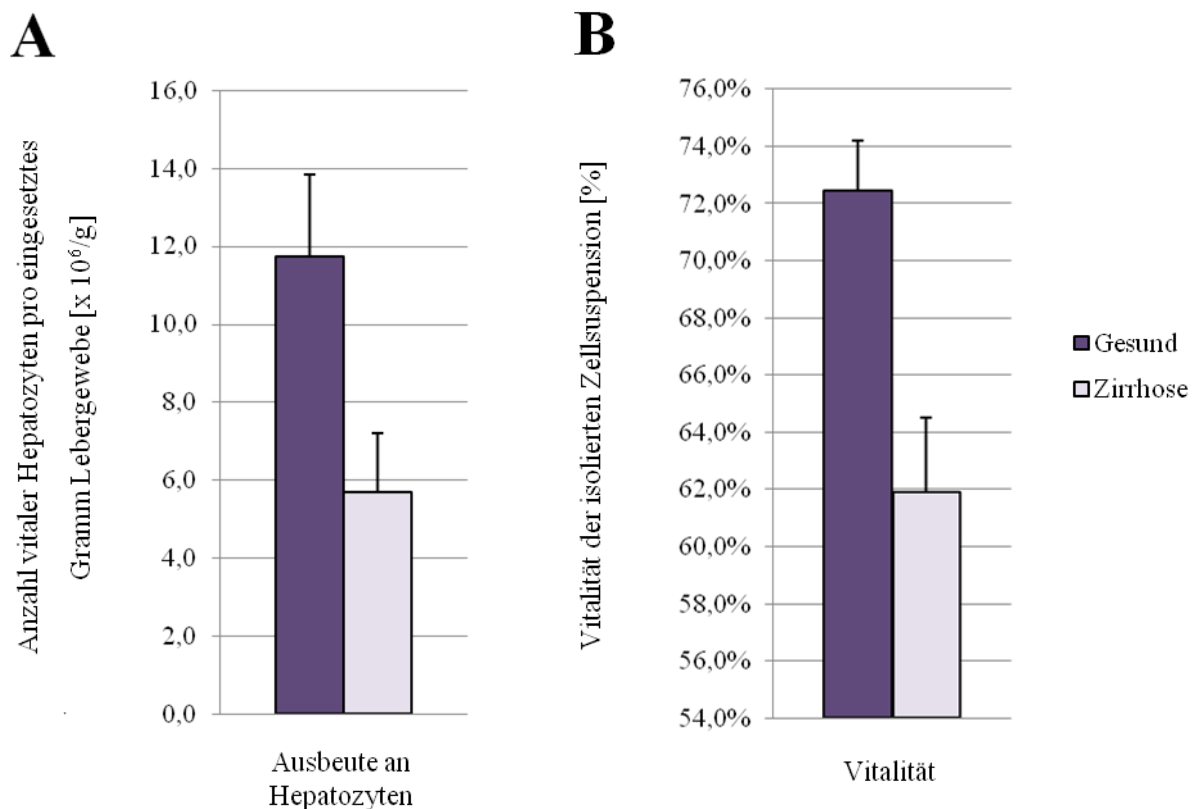
Bezeichnung	Version	Entwickler
Corel Photo-Paint	11	Corel, Kanada
GIMP	2.6.11	Spencer Kimball u. a.
Microsoft Office Excel 2007	12.0.4518.1014	Microsoft, USA
Microsoft Office PowerPoint 2007	12.0.4518.1014	Microsoft, USA
Microsoft Office Word 2007	12.0.4518.1014	Microsoft, USA
Reference Manager	12	Thomson Reuters, USA
SPSS Statistics	15.0	SPSS Inc., USA
Vector NTI	8	InforMax, USA
VirtualDub	1.9.11	Avery Lee

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Isolierung und Anreicherung der koloniebildenden Zellpopulation

#### 4.1.1 Kollagenase-Perfusion und Fraktionierung

Aus den Leberproben von 23 Spendern wurde das primäre Isolat mittels Kollagenase-Perfusions-technik gewonnen. Im Schnitt wurden dabei aus einem Gramm Lebergewebe  $9,1 \pm 7,1 \times 10^6$  vitale Zellen bei einer Vitalität der erhaltenen Suspension von  $68 \pm 9 \%$  isoliert. Stellt man den Isolierungen aus Geweben ohne Zirrhose solchen aus Materialien mit vorhandener Zirrhose gegenüber, so lässt sich bei gesunden Proben eine mehr als doppelt so hohe Ausbeute an vitalen Zellen bei einer um etwa 10 Prozentpunkte erhöhten Vitalität feststellen (Abb. 4.1).



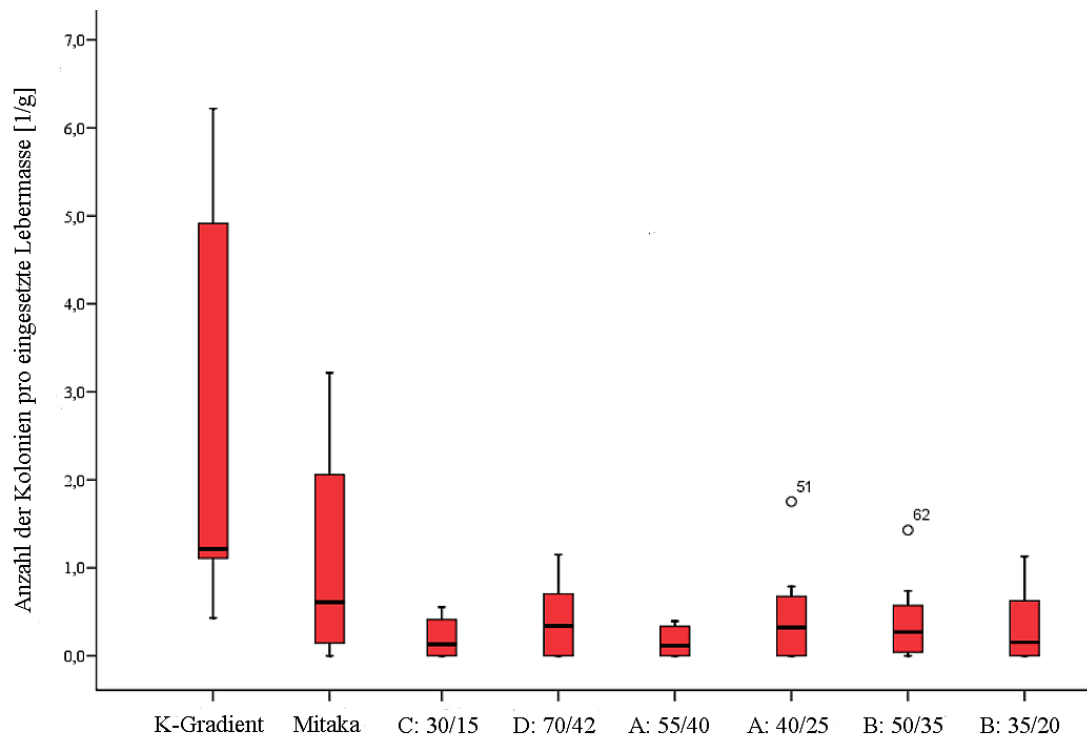
**Abbildung 4.1** Darstellung von Hepatozytenausbeute (A) und Vitalität der isolierten Zellsuspension (B) nach Kollagenase-Perfusion. Verglichen wurde der Perfusionsverdau von gesundem mit dem von zirrhotischem Spendermaterial. Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### 4.1.2 Effizienz der Fraktionierungen

Die Aufreinigung des primären Isolats erfolgte bei den ersten acht Isolierungen sowohl per Dichtegradientenzentrifugation als auch nach einem von Chen und Mitaka et al. beschriebenen Fraktionierungsprotokoll<sup>68</sup>. Die Zellausbeute aus den Interphasen der Dichtegradienten zeigte sich äußerst anfällig auf Abweichungen der Pipettiertechnik; erfolgte das Auftragen der Gradienten und der Zellsuspension zu schnell, verhinderte eine unzureichende Phasenbildung die Identifikation der Zielfraktion. Die vitale Zellausbeute aus den Fraktionierungen zeigte eine hohe Varianz sowohl innerhalb als auch zwischen den einzelnen Isolierungen; so waren die Fraktionen bei der Aussaat einer definierten Zelldichte (30 000 /cm<sup>2</sup>) jeweils unterschiedlich stark vertreten. Die Bestimmung der Kolonieausbeute aus den einzelnen Isolierungen erfolgte nach Aussaat anhand fortlaufender lichtmikroskopischer Auszählung von koloniebildenden Einheiten auf den Multiwell-Platten. Als koloniebildende Einheiten wurden nur solche gewertet, die aus einem Verband von mindestens zehn Zellen typischer Morphologie (siehe Abschnitt 4.3.1) bestanden. Unter Berücksichtigung der ausgesäten Zellmenge, des Einsatzes in die Fraktionierungen und der vitalen Zellausbeute nach Kollagenase-Perfusion wurde für jede einzelne Fraktionierung die maximale Kolonieausbeute zur eingesetzten Menge an gesundem Lebergewebe in Relation gesetzt und statistisch ausgewertet.

Aus den ermittelten Daten der verglichenen acht Gruppen lässt sich anhand der Mediane ableiten, dass bei den acht untersuchten Isolierungen die Fraktionierung mit dem K-Gradienten die meisten Kolonien pro eingesetztes Gramm Lebergewebe lieferte (Abb. 4.2). So ließ sich hier im Median eine Ausbeute von 1,3 Kolonien pro Gramm Gewebe erzielen, in einem Fall (Proben-ID 8, ethyltoxische Leberzirrhose) wurden 6,2 Kolonien pro Gramm Lebergewicht gewonnen. Dies entsprach gegenüber der Separationsmethode nach Mitaka einer mehr als doppelt so hohen Kolonieausbeute; in Relation zu den Fraktionierungen der Gradienten A, B, C, und D war der K-Gradient bis zu 10-fach effizienter.

Des Weiteren zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl an ausgezählten Kolonien zwischen Fraktionen, die auf Kollagen-beschichteten Wells und solchen, die auf Hyaluronsäure-beschichteten Wells ausgesät worden waren (Daten nicht dargestellt).



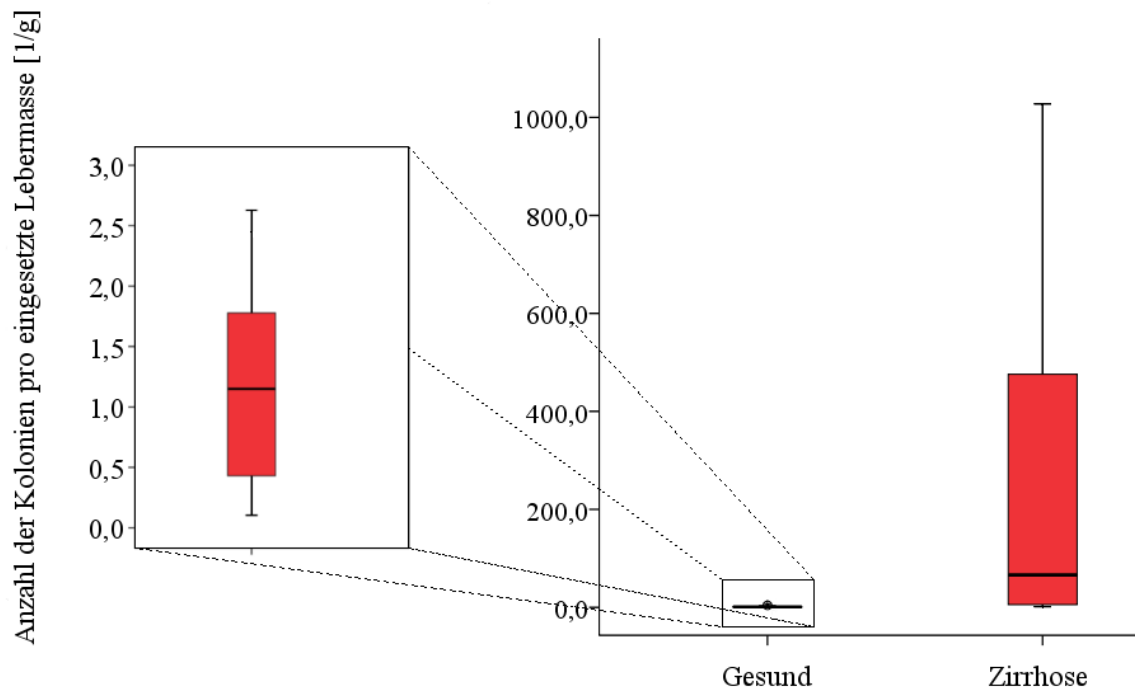
**Abbildung 4.2 Vergleich der Kolonieausbeuten aus den durchgeführten Fraktionierungen.** Darstellung als komplexe Box-and-Whisker-Plots nach Tukey. Mitaka: Isolat aus Fraktionierungsprotokoll nach Mitaka; N: x/y : Interphase aus Gradient N zwischen den Dichten x und y.

#### 4.1.3 Effizienz des K-Gradienten

Für die übrigen Isolierungen wurde ausschließlich der K-Gradient zur Separation eingesetzt. Analog zum Vergleich der einzelnen Fraktionierungen wurde jeweils die maximale Kolonieausbeute aller 23 Isolate berechnet.

Aus den Untersuchungen war ersichtlich, dass bei den Isolierungen aus Spendern mit bekannter Leberzirrhose im Median 66,2 Kolonien pro eingesetztes Gramm Gewebe erfasst wurden, während bei gesundem Lebergewebe 1,1 Kolonien pro Gramm beobachtet wurden (Abb. 4.3). Ausgehend davon brachten zirrhotische Leberproben somit etwa 60-mal mehr sichtbare Kolonien pro Gramm Gewebe hervor als nicht-zirrhotische. Rechnerisch reichte die Kolonieausbeute bei zirrhotischem Gewebe bis zu einem Maximalwert von 1027,7 Kolonien pro Gramm Gewebe.

Die höchsten Ausbeuten aus gesunden Lebern wurden bei Proben-ID 3 (4,2 Kolonien pro Gramm Lebergewebe) und Proben-ID 6 (6,2 Kolonien pro Gramm Lebergewebe) konstatiert. Beide Spenderorgane stachen insofern von den anderen heraus, als dass sie von verhältnismäßig jungen Patienten (Geburtsjahre: 1984, 1985) stammten.



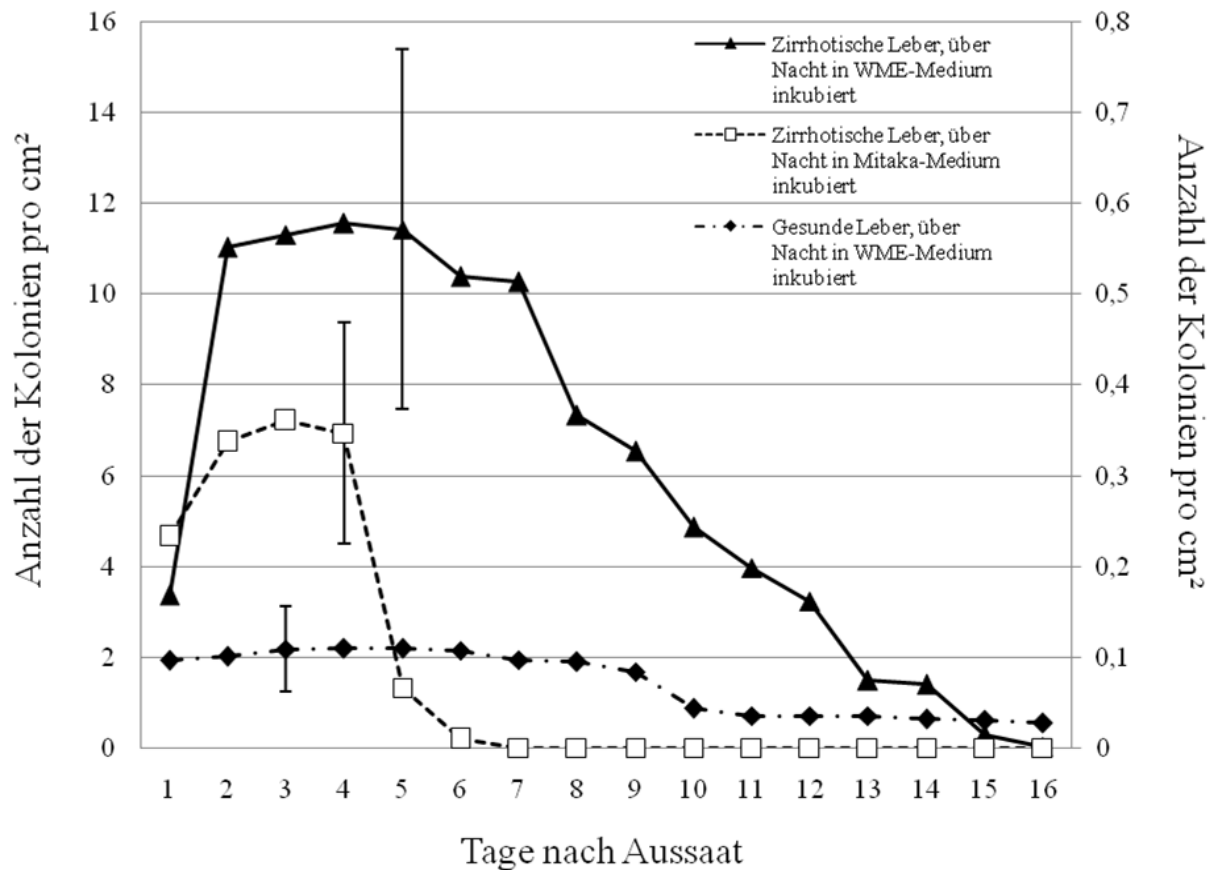
**Abbildung 4.3** Vergleich der Koloniausbeuten aus nicht-zirrhotischen und zirrhotischen Ausgangsmaterialien. Darstellung als Box-and-Whisker-Plots nach Tukey. Zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Größenordnungen zeigt der linke Bildausschnitt eine feinere Skalierung.

## 4.2 Kultivierung der koloniebildenden Zellpopulation

### 4.2.1 Kultivierung unter serumfreien Bedingungen im Zeitverlauf

Die mit Hilfe des K-Gradienten isolierten Zellfraktionen wurden jeweils in WME-Medium resuspendiert und mit einer Zelldichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  auf Kollagen- oder Hyaluronsäure-beschichteten Mikrotiterplatten ausgesät; ab dem Folgetag wurden die Zellen über einen Zeitraum von mindestens 30 Tagen serumfrei kultiviert sowie engmaschig mittels Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Ferner wurde die Hälfte der Fraktion ab der achten Isolierung direkt im serumfreien Mitaka-Medium gelöst und ausplattiert.

Abgesehen von den quantitativen Unterschieden bei der Koloniedichte auf den Multiwell-Platten zeigte sich im direkten Vergleich von Isolaten gesunder und zirrhotischer Lebern auch eine Diskrepanz hinsichtlich der zeitlichen Dynamik der Koloniedichte; blieb die initial ermittelte



**Abbildung 4.4** Koloniedichte auf den Mikrotiterplatten im Zeitverlauf. Gegenüberstellung von komplett serumfreier Kultivierung der Isolate aus zirrhotischen Lebern und partiell serumfreier Kultivierung der Isolate aus zirrhotischem sowie nicht-zirrhotischem Spendermaterialien. Darstellung des arithmetischen Mittels über die ersten 16 Tage in Zellkultur. Aus Gründen der Übersicht beschränkt sich die Illustration der Streuungen exemplarisch auf drei repräsentative Werte (SEM). Die linke Ordinate bezieht sich auf die Kolonien aus zirrhotischen Lebern, die rechte Ordinate auf die Kolonien aus gesunder Leber.

Koloniedichte bei gesundem Ausgangsmaterial von im Schnitt 0,1 Kolonien pro  $\text{cm}^2$  über die ersten neun Tage nach Aussaat etwa konstant, so war der Maximalwert bei zirrhotischen Proben (7,2 Kolonien pro  $\text{cm}^2$ ) unter ausschließlich serumfreien Konditionen erst am dritten Tag nach Aussaat erreicht (Abb. 4.4). Die Koloniedichte auf den Platten, die über die erste Nacht in WME-Medium inkubiert worden waren, verzeichnete demgegenüber einen noch steileren Aufstich zwischen dem ersten und zweiten Tag nach Aussaat mit dem Gipfel am vierten Tag (11,6 Kolonien pro  $\text{cm}^2$ ).

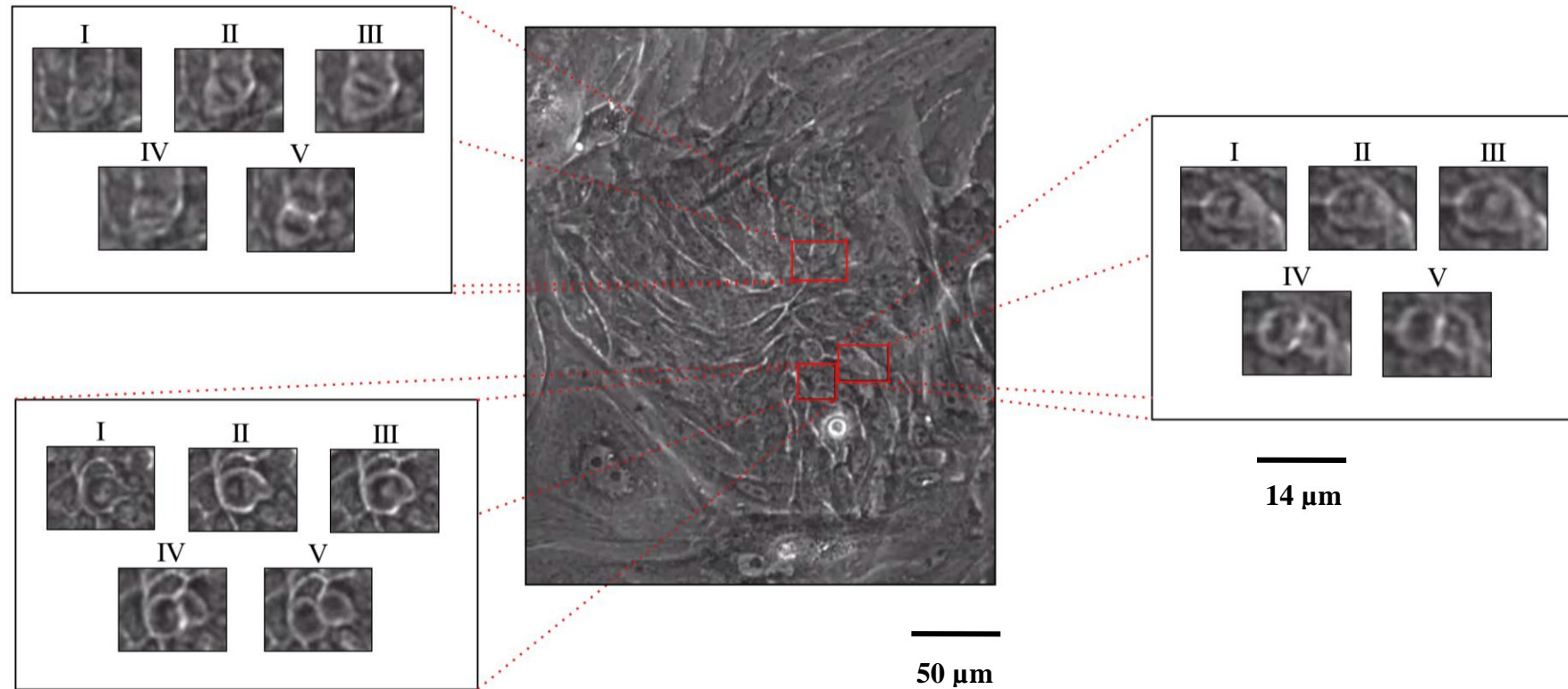
Bei leichter Regredienz der Koloniedichte nach dem neunten Tag konnten bei gesunden Spendern im Schnitt am 19. Tag nach Aussaat keine Kolonien mehr nachgewiesen werden. In einem Fall (Proben-ID 7, Diagnose: kolorektale Metastase) gelang die Kultivierung über den 65. Tag hinaus. Im Gegensatz dazu fiel bei zirrhatischen Lebern die Koloniedichte auf den Wells in vollständig serumfreier Kultur nach dem vierten Tag schlagartig ab, so dass am siebenten Tag nach Aussaat keine Kolonien mehr nachweisbar waren. Bei partiell serumfrei gehaltenen Isolaten von Zirrhotikern konnten mit sukzessivem Abfall der Dichte bis zum 15. Tag nach Aussaat Kolonien beobachtet werden.

Weder bezüglich der maximalen Koloniedichte noch der maximalen Überlebenszeit der Kolonien konnten Unterschiede zwischen den Aussaaten auf Kollagenbeschichtung und Hyaluronsäurebeschichtung festgestellt werden.

#### 4.2.2 Proliferationskapazität der Zellkolonien in serumfreier Kultur

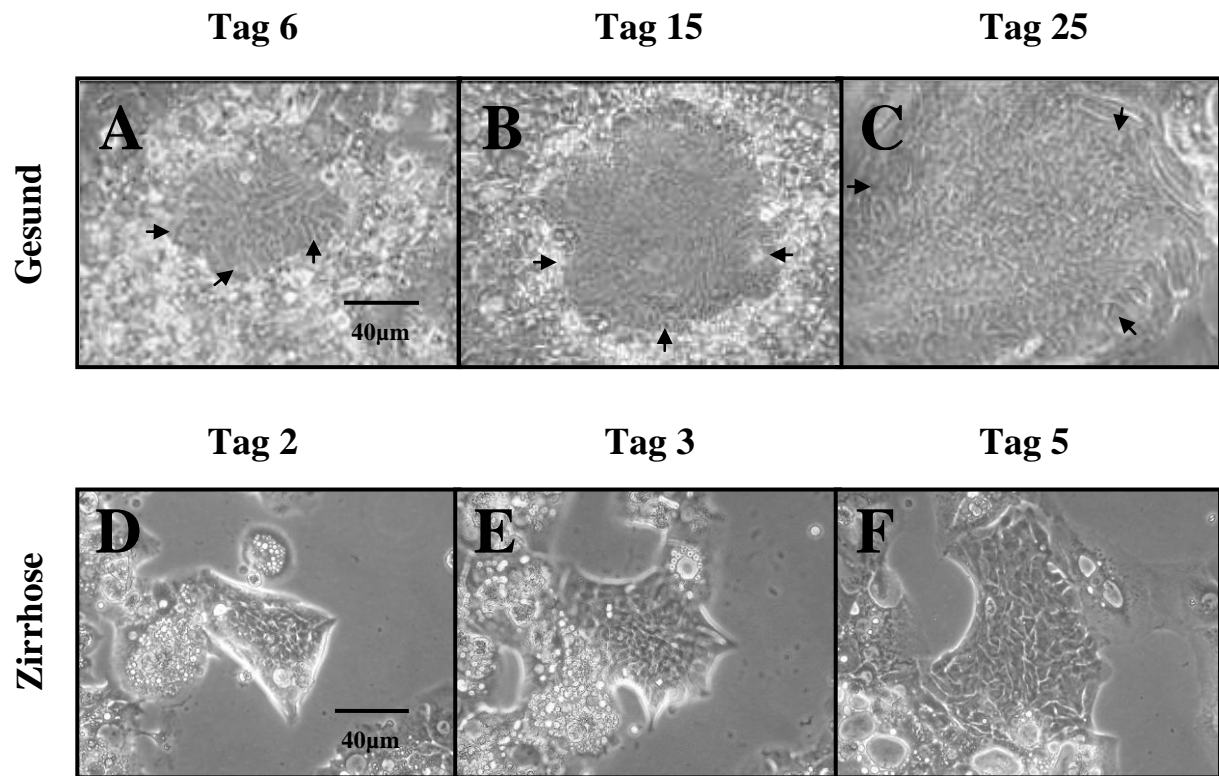
Das Proliferationspotential der koloniebildenden Zellpopulation wurde neben der Dokumentierung der Koloniedichte anhand lichtmikroskopischer Kontrollen und Zeitrafferaufnahmen einzelner Kolonien ausgewertet.

In zwei von mehreren Zeitrafferaufnahmen konnten Zellteilungen innerhalb einer Kolonie direkt beobachtet werden; so waren bei Proben-ID 9 (Diagnose: Zyste des Ductus choledochus) bei der Aufzeichnung einer Kolonie zwischen dem ersten und zweiten Tag nach Aussaat in einem Zeitintervall von 24 Stunden 22 verschiedene Mitosefiguren erkennbar (Abb. 4.5). Dies entspräche bei einer ursprünglichen Koloniegröße von etwa 60 Zellen einer Verdopplungszeit von schätzungsweise 65 Stunden. Eine weitere Kolonie aus Proben-ID 1 (Diagnose: hepatozelluläres Karzinom) zeigte zwischen dem ersten und zweiten Tag nach Aussaat binnen 17 Stunden neun Mitosen. In den parallel dazu aufgezeichneten reinen Hepatozytenkulturen im WME-Medium wurden keine Zellteilungen entdeckt.



**Abbildung 4.5 Mitotische Zellteilungen innerhalb einer Kolonie.** Die Bildausschnitte sind Auszüge einer Zeitrafferaufnahme, die von einer Kolonie aus Proben-ID 9 zwischen dem ersten und zweiten Tag nach Aussaat angefertigt wurde. Die vergrößerten Bildsequenzen zeigen drei von insgesamt 22 beobachteten Mitosefiguren. Die römischen Ziffern kennzeichnen in chronologischer Reihenfolge verschiedene Zeitpunkte der Zellteilung. Die abgebildeten Proliferationen traten in einem Zeitintervall von vier Stunden auf. Vergrößerung mittlerer Bildausschnitt: 100-fach; Vergrößerung der Sequenzen: 350-fach. Isolierung: Perfusionsverdau; Fraktionierung: K-Gradient; Beschichtung: Kollagen.



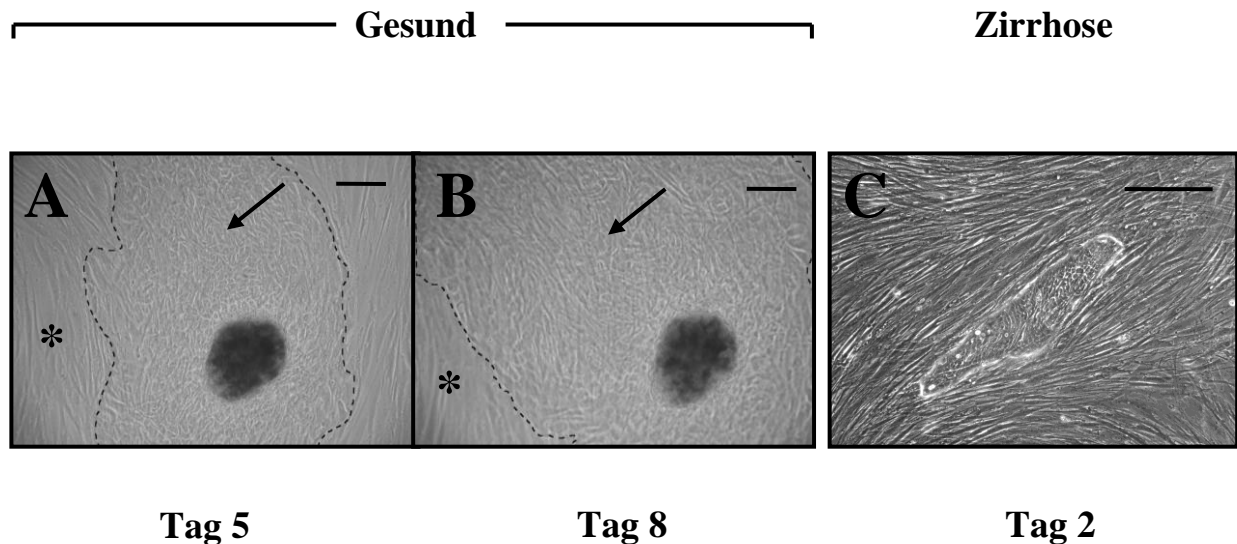


**Abbildung 4.6** Bildersequenzen wachsender Kolonien in der Zellkultur. Die beiden Fotoserien zeigen jeweils Phasenkontrastaufnahmen einer einzelnen Kolonie zu verschiedenen Zeitpunkten, die aus gesunder (A-C) und zirrhotischer (D-F) Leber isoliert worden war. Vergrößerung: 150-fach. (A-C) Die Kolonie stammt aus Proben-ID 10, Methode: Perfusionsverdau; Fraktionierung: K-Gradient; Beschichtung: Kollagen. Die Pfeile akzentuieren die Konturen der Kolonie. (D-F) Die Kolonie stammt aus Proben-ID 12; Isolierung: Perfusionsverdau; Fraktionierung: K-Gradient; Beschichtung: Kollagen.

In wenigen Fällen konnte innerhalb einzelner Kolonien sowohl zirrhotischer als auch gesunder Herkunft eine Zunahme der Zellzahl in Form von Fotoserien gezeigt werden (Abb. 4.6). Die Mehrheit der beobachteten Einheiten blieb jedoch statisch, bis sie durch Apoptose zugrunde ging oder sich spontan morphologisch wandelte (siehe Abschnitt 4.3.1).

### 4.2.3 Übertragung und Kokultur auf einem Feederlayer

Es wurde mehrfach der Versuch unternommen, koloniebildende Einheiten zu subkultivieren, indem sie nach manueller Mikrodissektion auf eine Schicht inaktivierter humaner Vorhautfibroblasten (HFF) übertragen wurden.



**Abbildung 4.7** Kolonien aus gesunder und zirrhotischer Leber nach Transfer auf Feederzellen. Beide abgebildeten Kolonien wurden über einen Perfusionsverdau und Separierung mittels K-Gradienten gewonnen. (A+B) Kolonie aus Proben-ID 10, die nach 20 Tagen in Kultur auf die Fibroblastenschicht überführt worden war; Phasenkontrastaufnahme jeweils an Tag 5 und Tag 8 nach Übertragung in 40-facher Vergrößerung. Die unterbrochene Linie demarkiert die Koloniegrenzen. Zentral sind apoptotische Zelltrümmer nicht adhärirter Kolonieanteile erkennbar. \*: humane Vorhautfibroblasten; →: übertragene Kolonie. Maßstabsbalken: 100µm. (C) Kolonie aus Proben-ID 12; Transfer auf Feederzellen nach 11 Tagen in Kultur; Phasenkontrastaufnahme an Tag 2 nach Übertragung in 50-facher Vergrößerung. Maßstabsbalken: 100 µm.

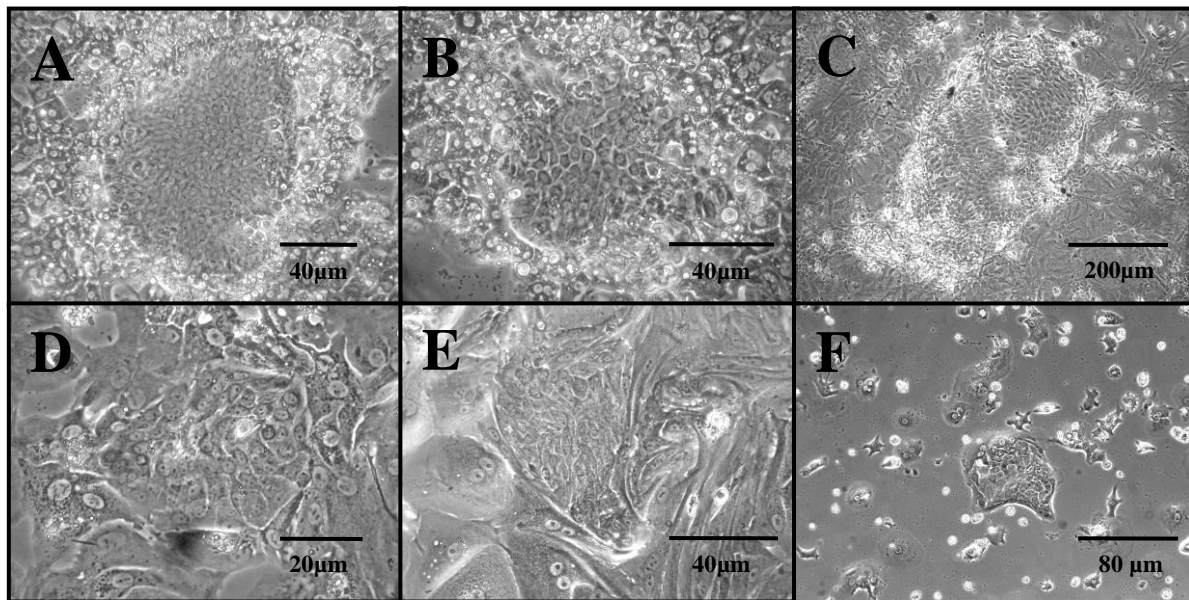
Bei insgesamt neun verschiedenen Versuchen gelang der Transfer auf die Feederzellen in zwei Fällen. Von sieben überführten Kolonien, die aus Proben-ID 10 (Diagnose: cholangiozelluläres Karzinom) stammten, adhärirte eine auf der Fibroblastenschicht. In mit Serum angereicherter Nährlösung wurde eine Expansion der Kolonie bis zum achten Tag nach Übertragung beobachtet (Abb. 4.7 A+B), obwohl jene Kolonie unter serumfreien Bedingungen zuvor bereits als statisch eingestuft worden war. Fortan sistierte das Wachstum, bis die Kolonie am 14. Tag nach Übertragung (34 Tage nach Aussaat) apoptotisch wurde. Im anderen Fall adhärirte eine von 14 überführten Kolonien, die aus Proben-ID 12 (Diagnose: ethyltoxische Leberzirrhose) hervorgegangen waren (Abb. 4.7 C). Diese konnte über neun Tage am Leben erhalten werden, bevor sie am 10. Tag nach Übertragung (21. Tag nach Aussaat) verendete. Hier ergab sich im Laufe der Kultivierung allerdings kein Anhalt für ein Wachstum der Kolonie.

### 4.3 Phänotypisierung der koloniebildenden Zellpopulation

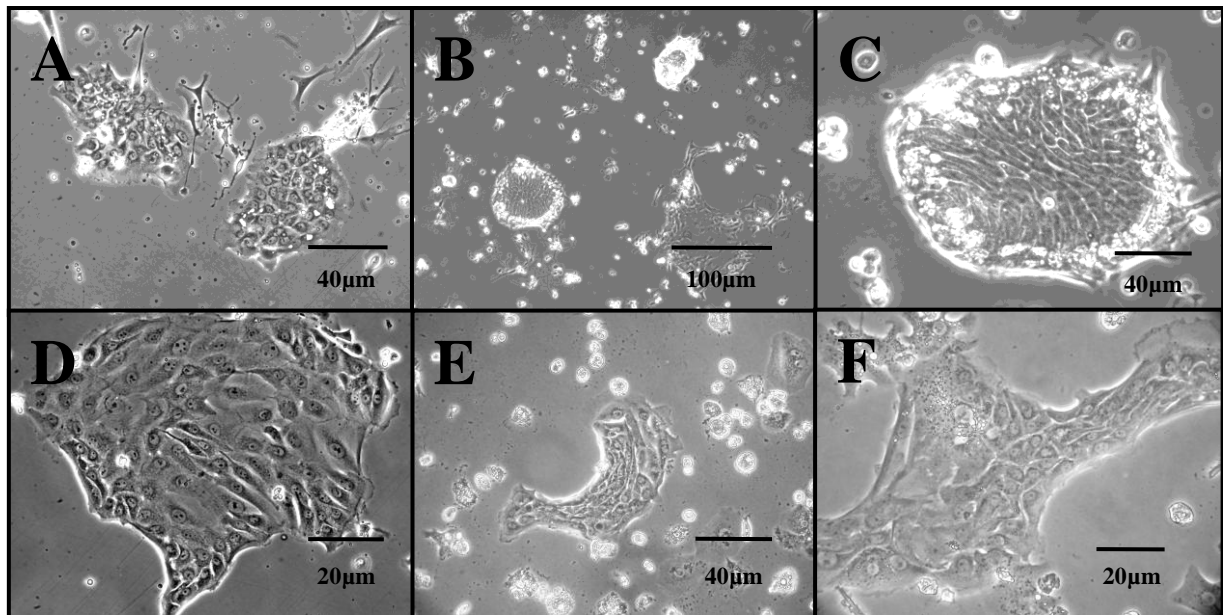
#### 4.3.1 Morphologische Aspekte

Der isolierte Zelltyp war in der Monolayerkultur unabhängig von Pathologie des Ausgangsmaterials und der Fraktionierungsmethode in Zellverbänden unterschiedlicher Form und Größe organisiert (Abb. 4.8 und 4.9).

Die aus gesundem Lebermaterial gewonnenen Zellen maßen zwischen 6 und 12  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und bildeten in der Regel Kolonien, die jeweils 20 bis 30 Zellen umfassten; in Einzelfällen wurden Koloniegrößen von über 250 Zellen pro Kolonie beobachtet. Während sich einige Kolonien – vor allem solche mit höherer Zellzahl – mit einer nahezu zirkulären oder ellipsoiden Form deutlich von den umgebenden Zellen in der Kultur abgrenzen ließen (Abb. 4.8 A-C), waren die Koloniegrenzen insbesondere bei hoher Hepatozytendichte weniger scharf und damit die Kolonien als solche für den Betrachter schwerer identifizierbar (Abb. 4.8 D+E).



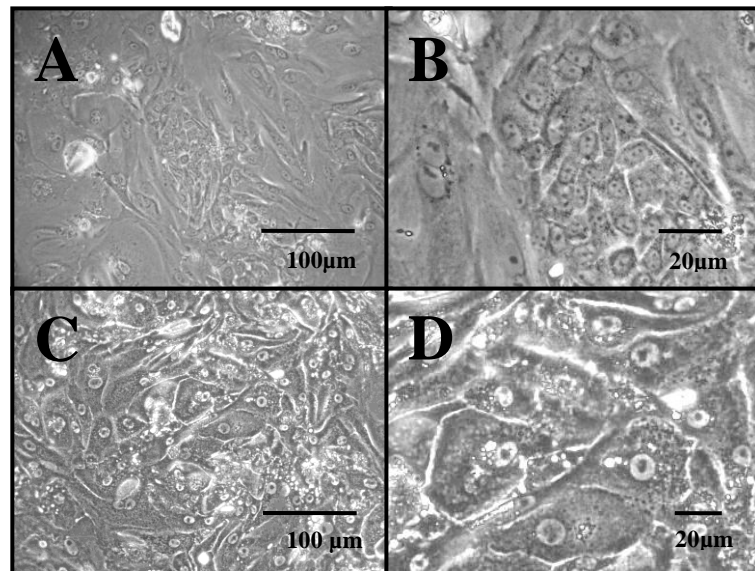
**Abbildung 4.8** Phasenkontrastaufnahmen diverser Kolonien, die aus nicht-pathologischem Lebergewebe isoliert worden waren. (A+B) Proben-ID 10; Methode: Perfusionsverdau; Fraktionierung: K-Gradient; Beschichtung: Kollagen; Tag 3. Vergrößerung: 150-fach und 200-fach. (C) Proben-ID 6; Methode: Perfusionsverdau; Fraktionierung: B; Interphase 35/20; Beschichtung: Kollagen. Vergrößerung: 40-fach. (D) Proben-ID 3; Methode: Perfusionsverdau; Fraktionierung: Mitaka-Protokoll; Beschichtung: Kollagen; Tag 5. Vergrößerung: 300-fach. (E) Proben-ID 1; Methode: Perfusionsverdau; Fraktionierung: K-Gradient; Beschichtung: Hyaluronsäure; Tag 2. Vergrößerung: 200-fach. (F) Proben-ID 1; Methode: Perfusionsverdau; Fraktionierung: Mitaka-Protokoll; Beschichtung: Hyaluronsäure; Tag 2. Vergrößerung: 100fach.



**Abbildung 4.9** Phasenkontrastaufnahmen diverser Kolonien, die aus zirrhotischem Lebergewebe isoliert worden waren. Alle Isolate wurden mittels Perfusionsverdau gewonnen, mit dem K-Gradienten fraktioniert und auf eine Kollagenschicht ausgesät. Initial wurden die Suspensionen über die erste Nacht in WME-Medium inkubiert, bevor es durch das Mitaka-Medium ausgetauscht wurde. (A) Proben-ID 12; Tag 3. Vergrößerung: 150-fach. (B+C) Proben-ID 12; Tag 1; Vergrößerung 80-fach und 150-fach. (D) Proben-ID 16; Tag 2. Vergrößerung: 200-fach. (E) Proben-ID 20; Tag 2. Vergrößerung: 150-fach. (F) Proben-ID 21; Tag 3. Vergrößerung: 250-fach.

Bei den aus zirrhotischen Spenderlebern stammenden Isolaten adhärierte eine wesentlich geringere Zahl an Zellen auf den Multiwell-Platten. Somit fielen die Kolonien hier neben zahlreichem apoptotischen Zellmaterial stärker auf. Die zellbildende Population unterschied sich morphologisch nicht von den Zellen aus gesunder Leber, jedoch waren die Kolonien mit 10 bis 20 Zellen pro Kolonie durchgehend kleiner und variabel geformt (Abb. 4.9). Das wüste Bild in der Zellkultur verstärkte sich durch die komplett serumfreie Kultivierung drastisch; so wurden bei direkter Aussaat im Mitaka-Medium abgesehen von den Zellkolonien keine weiteren adhärennten Zellformen lichtmikroskopisch gesehen.

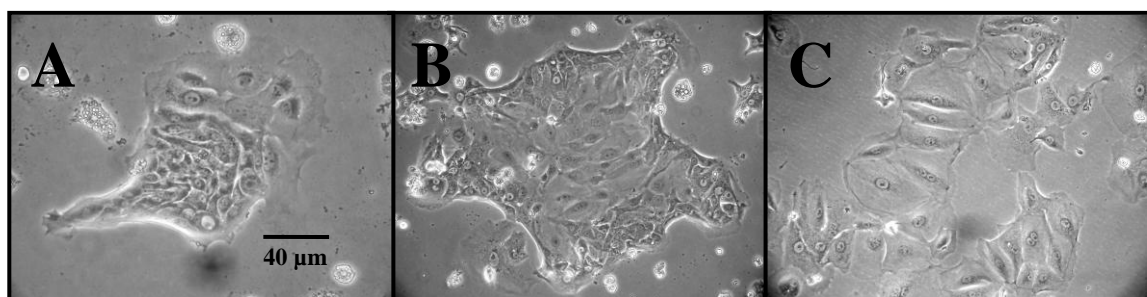
Die einzelnen Zellen wiesen zu Beginn der Kultivierungsdauer eine hohe Kern-Plasma-Relation bei einer teils rundlichen, bisweilen auch langgestreckten oder polyedrischen Zellform auf (Abb. 4.10 A+B). Hierbei war keinerlei Polarität der Zellen ersichtlich. Die ovalen Zellkerne imponierten fortwährend durch zwei bis drei im Phasenkontrast sichtbare Nucleoli. Im Vergleich dazu maßen die einzeln in WME-Medium oder in Kokultur gezüchteten adulten Hepatozyten bis zu 38 µm im Durchmesser und zeigten neben einem stark granulierten Zytoplasma eine geringe Kern-Plasma-Relation (Abb. 4.12 C+D). Die Hepatozyten waren zum Teil polynucleär mit überwiegend einem Nucleolus pro Zellkern.



**Abbildung 4.10** Mikroskopischer Vergleich der mutmaßlichen hepatischen Progenitorzellen mit adulten Hepatozyten.

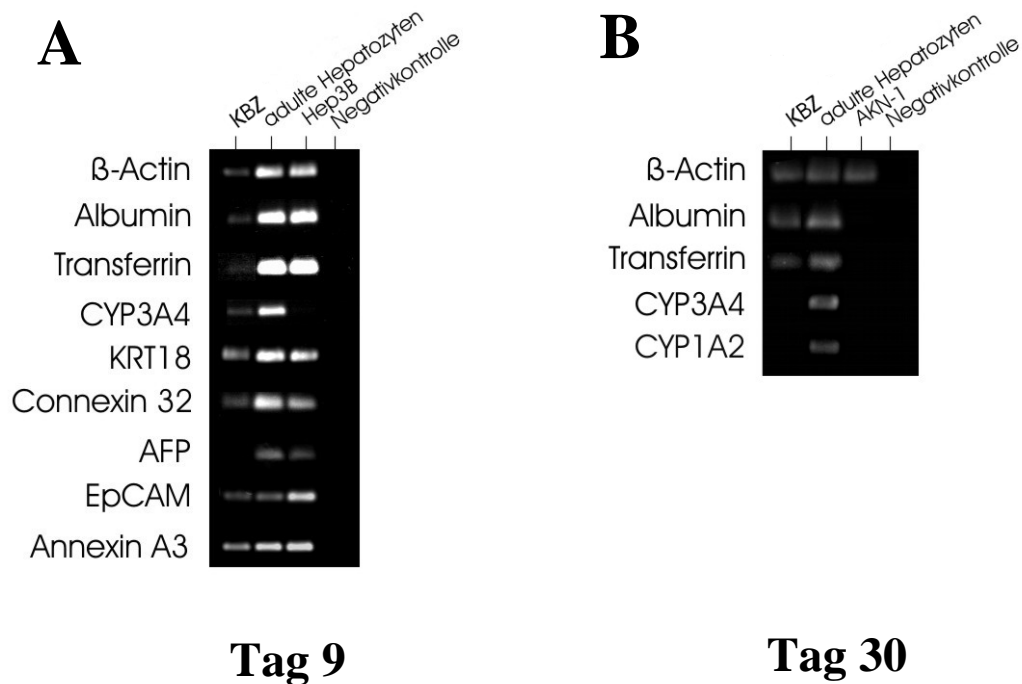
Die Phasenkontrastaufnahmen entstammen der Isolierung mit Proben-ID 6 nach Perfusionsverdau an Tag 2 nach Aussaat auf Kollagenbeschichtung. (A+B) Fraktionierung: K-Gradient; Inkubation in WME-Medium über Nacht, dann Kultivierung in Mitaka-Medium. Vergrößerung: 80-fach und 270-fach (C+D) Unfraktioniert; Kultivierung in WME-Medium. Vergrößerung: 80-fach und 200-fach.

Nach unterschiedlicher Dauer in Kultur (siehe Abschnitt 4.3.1) ging ein Großteil der Kolonien durch Apoptose zugrunde; dabei schrumpften zunächst die peripher gelegenen Zellen einer Kolonie, bevor das komplette Zellkonglomerat von der Beschichtung des Wells dissoziierte. Bei einigen Kolonien wurde ein zellulärer Gestaltwandel beobachtet, der häufig vom Koloniezentrum ausging, bevor er die anderen Kolonieanteile erfasste (Abb. 4.11). Die Zellen zeigten eine Zunahme des zytoplasmatischen Volumens, wodurch die Zellgröße bis zum Fünffachen ihres Ursprungswertes anstieg. Zudem wiesen die Zellen ein klares Zytoplasma und unscharfe Konturen mit angedeuteten Zellausläufern auf. In diesem Status verharrten die Kolonien, bis sie schließlich durch Apoptose verendeten.



**Abbildung 4.11** Änderung der Morphologie einzelner Kolonien in der Zellkultur. Die Fotos im Phasenkontrast dokumentieren den Formwandel unterschiedlicher Kolonien in der Zellkultur. Die abgebildeten Zellverbände stammen aus zirrhotischen Lebern nach Perfusionsverdau, Fraktionierung mit K-Gradient und Aussaat auf Kollagenbeschichtung. Vergrößerung: 150-fach. (A) Die Kolonie zeigt hybridartig neben den mutmaßlichen Progenitorzellen in der Peripherie einzelne veränderte Zellen. Proben-ID 20; Tag 3. (B) Morphologischer Wandel der Zellen ausgehend vom Zentrum der Kolonie; Proben-ID 21; Tag 7. (C) Vollständig transformierte Kolonie; Proben-ID 21; Tag 9.

## 4.3.2 RT-PCR



**Abbildung 4.12 Polymerase-Kettenreaktion ausgewählter Marker aus cDNA von koloniebildenden Einheiten.** Es wurden jeweils 100 ng cDNA pro Versuchsansatz eingesetzt. Die Kolonien waren aus dem Lebermaterial durch Perfusionsverdau isoliert, mittels K-Gradienten fraktioniert und auf Kollagenbeschichtung ausgesät worden. Die Positivkontrollen waren separat unter anderen Bedingungen kultiviert worden. Die Visualisierung erfolgte durch Ethidiumbromid. (A) Kolonien aus zirrhotischer Leber, am neunten Tag nach Aussaat; Proben-ID 19. (B) Kolonien aus gesunder Leber, am 30. Tag nach Aussaat; Proben-ID 6. KBZ: koloniebildende Zellen.

Zur Charakterisierung des koloniebildenden Zelltyps wurde aus einzelnen Kolonien Gesamt-RNA extrahiert und eine qualitative PCR mit ausgewählten Primern durchgeführt (Abb. 4.12). Die Kolonien, aus denen eine für die Analyse genügende RNA-Menge mit adäquatem Reinheitsgrad gewonnen werden konnte, stammten hierbei einerseits aus Isolaten von gesundem Lebermaterial an Tag 30 nach Aussaat (Proben-ID 6, Diagnose: hepatische kolorektale Metastase), andererseits aus zirrhotischer Spenderleber an Tag 9 nach Aussaat (Proben-ID 19).

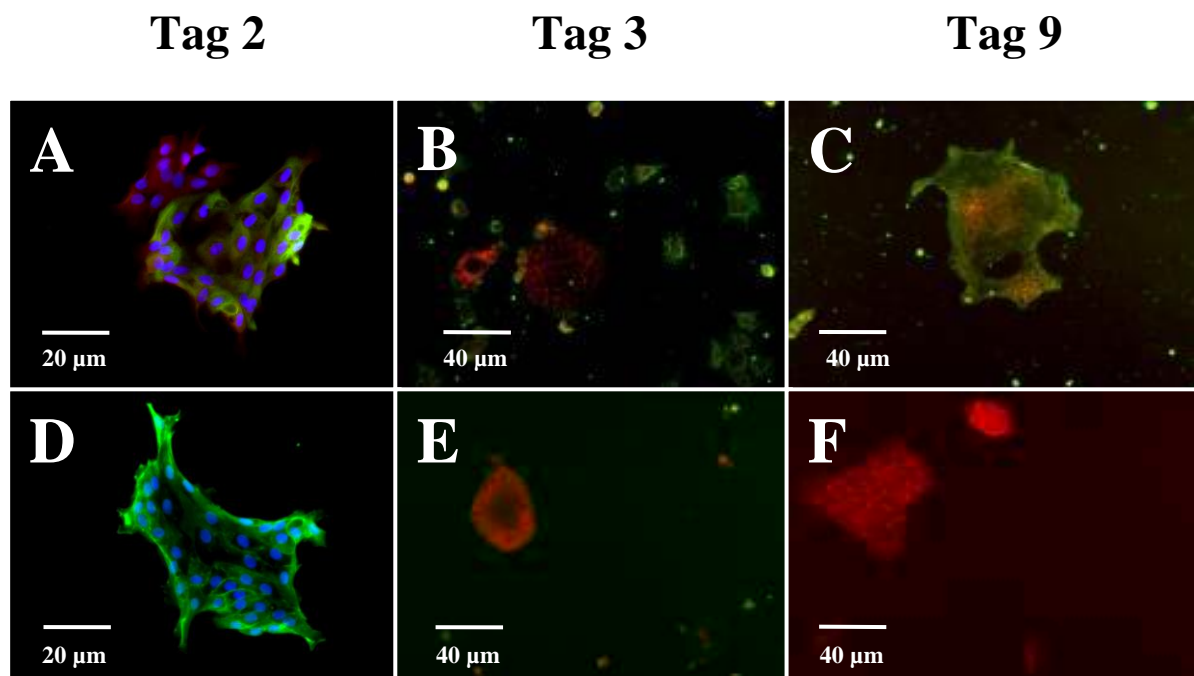
Die Kolonien aus zirrhotischer Leber wiesen eine schwache mRNA-Expression für Albumin, Transferrin und CYP3A4 auf, die Banden für Zytokeratin 18, Connexin 32, EpCAM und Annexin A3 waren hingegen signalintensiver. Eine AFP-Expression konnte hier nicht gezeigt werden.

Die Kolonien aus gesundem Lebermaterial exprimierten ebenso mRNA für Albumin und Transferrin, eine Expression von CYP3A4 und CYP1A2 blieb nunmehr aus.

### 4.3.3 Immunfluoreszenzfärbungen

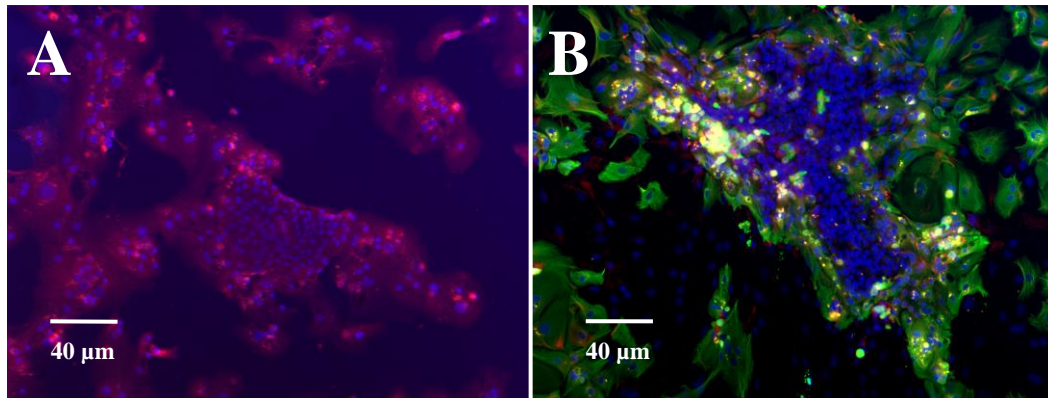
Die Expressionsanalyse des Zelltyps mittels PCR wurde durch eine Reihe von Immunfluoreszenzfärbungen zur weiterführenden Bestimmung des Phänotyps ergänzt. Dabei wurden Kolonien zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf den Mikrotiterplatten hinsichtlich der Präsentation ausgewählter Marker getestet (Abb. 4.13 und 4.14).

Die Kolonien, die aus zirrhatischen Lebern isoliert worden waren, färbten deutlich positiv für EpCAM, NCAM, und Annexin A3 an. Bei CK19 zeigte sich zwar ein deutliches Signal, jedoch ein inhomogenes Fluoreszenzmuster innerhalb der Kolonien; so wurden in der Peripherie liegende Anteile der Kolonie am zweiten Tag in Kultur ausgespart (Abb. 4.13 A). CD44v6 ließ sich am dritten Tag und am neunten Tag sowohl in den Kolonien selbst als auch in den umliegenden Zelltrümmern nachweisen; am neunten Tag war das von den Kolonien ausgehende Signal wesentlich intensiver als an Tag 3 (Abb. 4.13 B+C). Zudem ließ sich ein positiver, wenngleich schwacher Nachweis für die Expression von HNF-4 $\alpha$  an den Tagen 3 und 9 nach Aussaat beobachten. Die Kolonien zeigten sich stets negativ für den Ovalzellmarker OV-6.



**Abbildung 4.13 Immunfluoreszenzaufnahmen von Kolonien aus zirrhatischen Lebern zu verschiedenen Zeitpunkten.** Die abgebildeten Kolonien stammten aus Proben-ID 14 und wurden an Tag 2 (A+D), Tag 3 (B+E) und an Tag 9 (C+E) nach Aussaat gefärbt. Zuvor waren sie über einen Perfusionsverdau und Separation mittels K-Gradienten isoliert worden. (A) Annexin A3 (rot); Zytokeratin 19 (grün); DAPI (blau). Vergrößerung: 200-fach. (B+C) HNF-4 $\alpha$  (rot); CD44v6 (grün). Vergrößerung: 100-fach. (D) EpCAM (grün); DAPI (blau). Vergrößerung: 200-fach. (E+F) NCAM (rot); OV-6 (grün). Vergrößerung: 100-fach.

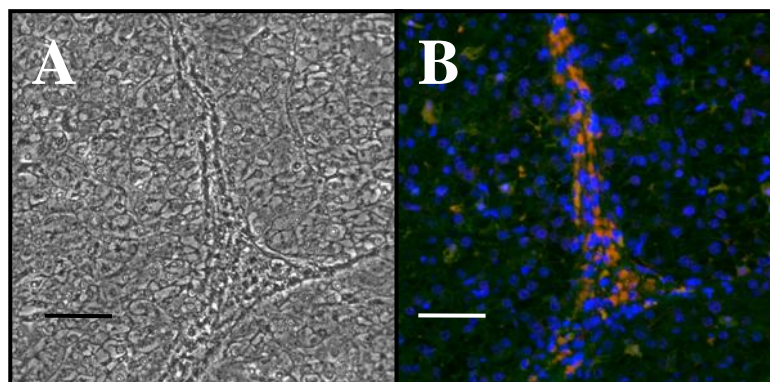
Die Kolonien, die den Isolierungen aus nicht-zirrhotischen Lebern entstammten, wurden an Tag 27 nach Aussaat gefärbt (Abb. 4.14); hierbei färbten die Zellen unter Aussparung des Kolonie-zentrums stark positiv für Zytokeratin 18 an. Während Annexin A3 schwach positiv fluoreszierte, fiel der Nachweis von Vimentin und CD90 bei den Kolonien negativ aus.



**Abbildung 4.14 Immunfluoreszenzaufnahmen von Kolonien aus nicht-zirrhotischen Lebern.** Die abgebildeten Kolonien stammten aus Proben-ID 3 und wurden an Tag 27 nach Aussaat gefärbt. Zuvor waren sie über einen Perfusionsverdau und Separation mittels K-Gradienten isoliert worden. Vergrößerungen: 100-fach. (A) Annexin A3 (rot); CD90 (grün); DAPI (blau). (B) Vimentin (rot); Zytokeratin 18 (grün); DAPI (blau).

Zusätzlich wurden histologische Schnitte aus zirrhotischer Leber angefertigt und mit Antikörpern gegen CD44v6 und CD133 angefärbt (Abb. 4.15).

Nativ ist die pathologisch bedingte Destruktion der hepatischen Histoarchitektur erkennbar. Als einzige histo-anatomisch definierte Strukturen sind hier das Periportalfeld und die interlobulären Septen klar identifizierbar. Bei weitestgehend homogenem Fluoreszenzmuster des gesamten



**Abbildung 4.15 Immunhistochemische Färbung eines zirrhotischen Gewebeschnittes.** (A) Native Phasenkontrastaufnahme mit Anschnitt eines Periportalfeldes. Vergrößerung: 100-fach. Maßstabsbalken: 40 µm. (B) Immunfluoreszenz des identischen Ausschnittes für CD133 (rot) und CD44v6 (grün); DAPI (blau).



Schnitten wurden intralobulär disseminierte Inseln erhöhter Signalintensität für CD44v6 beobachtet. Die Färbung für CD133 offenbarte eine Konzentration des Markers im Periportalfeld und in den interlobulären Septen; vereinzelt wurden auch hier CD133-positive Zellen intralobulär aufgefunden.

## 5. Diskussion

Im Zuge des dargestellten Projektes ist es gelungen, aus humanen gesunden sowie zirrhotischen Leberresektaten einen koloniebildenden Zelltyp zu isolieren. Nachfolgend werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert; dabei erfolgt zunächst die kritische Betrachtung der Isolierungstechnik und des Verhaltens der Kolonien unter definierten Kulturbedingungen, bevor die Identität des Zelltyps erörtert wird. Ferner wird auf die mutmaßliche Lokalisation der Zellen *in vivo* eingegangen und über die Eignung der Zellen für regenerative Verfahren reflektiert.

### 5.1 Evaluation der Isolierung und ihre Grenzen

#### 5.1.1 Auswertung der Fraktionierung

Nach dem Kollagenase-Perfusionsverdau der Resektate wurden zur Anreicherung potentieller Vorläuferzellen eine Dichtegradientenzentrifugation mittels Percoll® oder alternativ eine Fraktionierungsmethode nach Mitaka angewendet<sup>68</sup>. Hierbei wurden bei acht Isolierungen fünf verschiedene Gradienten eingesetzt und hinsichtlich ihrer Koloniausbeute miteinander verglichen. Das Ziel war es, unter den Verfahren das effizienteste zu eruiieren, um die Koloniausbeute der Folgeisolierungen zu maximieren. Aus den Resultaten wurde ersichtlich, dass der K-Gradient (Übereinanderschichten von 45 % und 30 % Percoll®) mit Abstand die höchsten Koloniezahlen lieferte, gefolgt von der Separationsmethode nach Mitaka<sup>68</sup>.

Die deutliche Überlegenheit des K-Gradienten gegenüber den anderen Verfahren lässt vermuten, dass die koloniebildende Zellfraktion im Dichteintervall von 45 % ( $\cong$  505,8 g/l) bis 30 % Percoll® ( $\cong$  337,2 g/l) im Isolat am reinsten vorliegt. Daraus ließe sich die These folgern, dass in diesem Bereich die Dichte der isolierten Population maximale Spezifität erreicht. Nagai et al. gelang die Isolierung stammzellartiger Zellen aus adulten Lebern mittels diskontinuierlichem Percoll®-Gradienten zwischen 1070 g/l und 1035 g/l<sup>122</sup>. Dies weicht erheblich von unserer Beobachtung ab und suggeriert, dass hier ein anderer Zelltyp gewonnen wurde. Weitere vergleichbare Untersuchungen zur Optimierung der Isolierungsmethoden sind dem Autor bis dato nicht bekannt. Augenscheinlich konnten nur wenige Autoren mit Zentrifugationsverfahren Erfolge verzeichnen<sup>69, 78</sup>. Bei den meisten Publikationen zu humanen Spendern wird den immunselektiven Verfahren der Vorzug gegeben.

Die Grundidee hinter der Selektion hepatischer Stamm- und Progenitorzellen anhand ihrer spezifischen Dichte und Größe basiert auf der Beobachtung, dass sämtliche in der Literatur beschriebenen Vorläuferzellen der Leber signifikant kleiner als reife Hepatozyten oder Cholangiozyten sind. Es ist daher davon auszugehen, dass sich Vorläuferzellen vornehmlich in der sog. nicht-parenchymatösen Zellfraktion (NPC) anreichern; darunter versteht man den Überstand, der sich bei herkömmlicher Zentrifugation einer isolierten Zellsuspension von dem dichteren Pellet aus überwiegend adulten Hepatozyten abhebt. Die NPC umfasst u. a. Stellatzellen, Kupffer'sche Sternzellen und Endothelzellen, aber auch kleinere Hepatozyten und Cholangiozyten.

Chen et al. (Arbeitsgruppe von Mitaka) zeigten mit einem patentierten Multistep-Zentrifugations-Protokoll eine hocheffektive Methode zur Separation von tierischen und humanen *Small Hepatocytes*<sup>68</sup>. Die nachrangige Bedeutung des Verfahrens im vorliegenden Experiment veranschaulicht, dass es zur Anreicherung der koloniebildenden Zellen (KBZ) durchaus tauglich erscheint, aber in weitaus geringerer Dimension als von den Autoren Chen et al. dargestellt. Dies könnte ein indirekter Hinweis darauf sein, dass die isolierten KBZ nicht mit *Small Hepatocytes* gleichzusetzen sind.

Die erfolgreiche Etablierung des K-Gradienten darf nicht darüber hinwegtäuschen, dass die größtmögliche Reinheit der KBZ in Suspension womöglich verlustreich erkaufte wird. Die Koloniausbeute aus einer definierten Fraktion ist bei konstant ausgesäter Zellzahl lediglich als Indikator für den Anteil der KBZ in der Suspension aufzufassen. Eine hohe Koloniezahl ist damit nicht gleichbedeutend mit der pauschalen Behauptung, die KBZ wären in diesem Dichteintervall am stärksten vertreten. Die Tatsache, dass alle Gradienten in einem Dichtebereich zwischen 70 % Percoll® bis 15 % Percoll® Kolonien hervorbrachten, spricht für ein breites Dichtespektrum der Zielzellen, ohne jedoch einen Schluss auf die quantitative Verteilung zuzulassen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass bei Beschränkung auf eine bestimmte Fraktion eine Vielzahl der KBZ nicht erfasst wird und sich damit der Isolierung entzieht. Abhilfe könnte die gezielte Depletion anderer Zelltypen schaffen. Die Anwendung immunselektiver Verfahren ist mit den geringsten Verlusten verknüpft, setzt aber auch gleichzeitig die Kenntnis spezifischer Marker oder Markerprofile voraus.

Trotz der hohen Koloniausbeute konnte selbst mit dem K-Gradienten keine absolute Selektion der KBZ erreicht werden; eine solche wäre mit der Dichte als alleinigem Filterparameter naturgemäß utopisch. Daher wurde sporadisch versucht, durch Änderung der Beschichtung die Oberflächenexpression des Integrins CD44 als weiteres Selektionskriterium einzuführen. Einzelne Studien hatten von einer erfolgreichen Isolierung mittels Aussaat auf Hyaluronsäurebeschichteten Kulturplatten berichtet mit Verweis auf den Hyaluronsäurerezeptor CD44 als

spezifischen Progenitorzellmarker<sup>69, 71</sup>. Die vorliegenden Erhebungen zeigten bei der Verwendung von Hyaluronsäure gegenüber der Kollagenbeschichtung keinerlei Unterschiede bezüglich der Kolonieausbeute oder der Heterogenität in der Kultur. Somit konnte dies zumindest für den isolierten Zelltyp nicht bestätigt werden. Eine Erklärung dafür könnte die unsystematische Durchführung mit kleiner Fallzahl liefern, ebenso wie die umstrittene Spezifität von CD44 in seiner Isoform 6 für Progenitorzellen. CD44 ist ein bei Säugern in vielen Geweben vorkommendes Antigen<sup>123</sup>. Darüber hinaus lässt sich durch die vorliegende Arbeit per se diese Annahme bestätigen: Abschnitt 4.3.3 dokumentiert sowohl in den Kolonien als auch in umliegenden Zellen eine CD44v6-Expression; eine selektive Zell-Matrix-Interaktion wäre damit anzuzweifeln.

Der Mangel an Selektivität und die daraus resultierende Heterogenität in der Zellkultur stellt die kardinale Schwäche der Methode dar. Für zukünftige therapeutische Anwendungszwecke wären Reinkulturen erwünscht und am risikoärmsten. Ein unmittelbarer Nachteil ergab sich auch für die Phänotypisierung der KBZ; aufgrund der Kontamination mit anderen Zelltypen war zur Gewinnung der Gesamt-RNA ein gezieltes Auffangen der Zellen mittels manueller Mikrodissektion notwendig, eine äußerst aufwändige und fehlerbehaftete Technik.

Ein weiteres methodisches Defizit offenbart sich bei der Betrachtung der Handhabung der Gradienten. So führte ein zu schnelles Auftragen der Lösungsmittel und der Zellsuspension regelmäßig zu einer verminderten Trennschärfe der späteren Interphasen, bis hin zu einem völligen Verschwimmen ohne Phasenbildung. Diese Störanfälligkeit trägt zu einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand bei und beeinträchtigt die Effizienz des Verfahrens. Es bleibt offen, inwiefern eine Automatisierung der Methode diese Unzulänglichkeit minimieren könnte.

Die Anreicherung der KBZ – und damit der potentiellen hepatischen Progenitorzellen (HPCs) – mittels Dichtegradientenzentrifugation erwies sich letztendlich als hilfreiches Verfahren, das jedoch aufgrund hoher Verluste, mangelnder Spezifität und störungsempfindlicher Prozeduren Raum für Verbesserungen zulässt. Eine industrielle Nutzung rückt angesichts dieser Probleme in den Hintergrund; hier empfehlen sich vielversprechendere Techniken wie die Immunselektion. Mit der Separationsmethode nach Mitaka konnte die geschilderte Ausbeute für den vorliegenden Zelltyp nicht reproduziert werden; sie blieb damit hinter den Erwartungen zurück.

### 5.1.2 Gegenüberstellung gesunder und zirrhotischer Resektate

Mit der Identifizierung des optimalen Gradienten wurden die Isolierungen systematisch auch auf zirrhotische Lebern ethyltoxischer Genese ausgeweitet; insgesamt wurden 23 Leberteilresektate als Ausgangsmaterial herangezogen, wobei es sich um 13 Resektionen im Gesunden und 10 zirrhotische Präparate handelte. Die Analyse der maximalen Kolonieausbeuten zeigte auf, dass bei zirrhotischen Lebern mit 66,2 Kolonien pro Gramm Gewebe eine etwa 60-fach höhere Ausbeute als bei gesunden Teilresektaten erzielt wurde. Unter den gesunden Resektaten konnten die meisten Kolonien bei den jungen Spendern (25 und 26 Jahre) nachgewiesen werden.

Spätere Betrachtungen zum Phänotyp der KBZ (Abschnitt 5.3.2) liefern Anhalt dafür, dass die isolierten Kolonien aus zirrhotischen und gesunden Lebern auf den gleichen Zelltyp zurückzuführen sein könnten. Damit liegt angesichts der immensen Diskrepanz in der Kolonieausbeute der Schluss nahe, dass diese Zellentität in zirrhotischen Lebern deutlich stärker vertreten ist als in unbeschadetem Gewebe.

Roskams und Spee et al. wiesen in einer Reihe humaner und tierischer Lebererkrankungen wie chronischer Hepatitis C, primär biliärer Zirrhose, nicht-alkoholischer und alkoholischer Steatohepatitis hepatische Progenitorzellen nach, deren Menge mit dem Grad der Schädigung korrelierte<sup>54, 124, 125</sup>. Vermutlich ist dafür eine gesteigerte Aktivierung des hepatischen Stammzellkompartiments verantwortlich, wie es das Modell der alternativen Regeneration nach chronischer Schädigung postuliert<sup>10</sup>. In seiner Konsequenz teilt sich die ruhende Stammzelle zunächst asymmetrisch, bevor die dabei entstandenen Progenitorzellen in großem Ausmaß proliferieren. Es wäre also denkbar, dass auch zirrhotische Lebern, die auf einen langjährigen Alkoholabusus zurückgehen, vermehrt Vorläuferzellen aufweisen. Diese Hypothese wird ferner durch das pathophysiologische Verständnis der Leberzirrhose gestützt, demzufolge die Fibrogenese stets mit regenerativer Aktivität einhergeht<sup>126</sup>. Das Bilden von Kolonien *in vitro* ist eine Eigenschaft, die typischerweise Zellen mit Stammzellcharakter zugeordnet wird. Gesetzt den Fall, die isolierte koloniebildende Zellpopulation sei ein Vorläuferzelltyp, so spräche das Ergebnis in der Tat für einen höheren Gehalt an Stamm- oder Progenitorzellen in den verwendeten zirrhotischen Lebern.

Bemerkenswert an den angestellten Beobachtungen ist, dass die zirrhotischen Lebern bei der Isolierung den gesunden Resektaten in Sachen Zellausbeute und Vitalität der Suspension deutlich unterlegen waren (Abb. 4.1). Dollé et al. schreiben der Überexpression von Komponenten der extrazellulären Matrix - wie es bei Zirrhoselebern die Regel ist - eine verminderte Effizienz des enzymatischen Verdaus zu<sup>14</sup>. Hieraus wird ersichtlich, dass die Kollagenase-

Perfusionstechnik für zirrhotisch durchsetzte Lebern eine eher inadäquate Isolierungsmethode darstellt. Dies war mitunter ein Grund dafür, dass zirrhotische Lebern bei Isolierungen bisher nicht berücksichtigt worden sind. Die geglückte Verwendung in unserem Versuch hieße im Umkehrschluss, dass die Koloniausbeute bei optimal zugeschnittener Isolierungsmethode deutlich höher ausfallen könnte.

Neben den bereits angesprochenen Grenzen der Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung sei an dieser Stelle angemerkt, dass die prinzipielle Verwendung des K-Gradienten bei zirrhotischen Leberresektaten mit Problemen verknüpft sein könnte; so wurden bei der Identifizierung des optimalen Dichtebereiches fast ausschließlich gesunde Resektate zur Testung herangezogen. Eine Übertragung auf pathologische Lebern ist strittig, da davon auszugehen ist, dass der Anteil an nicht-parenchymatösen Elementen in der Leber bei Zirrhose erhöht ist; die Fibrogenese ist mit einer Zunahme von Fibroblasten, aktivierten Stellatzellen, Kupffer-Zellen und interstitiellen Fasern assoziiert<sup>126</sup>. So könnten gerade diese Komponenten die Spezifität des K-Gradienten und dessen Validität beeinträchtigen. Dies wurde beim Studiendesign nicht berücksichtigt.

Die Koloniausbeute nach Isolierung unterliegt den unterschiedlichsten Einflüssen; neben der Art und Qualität der Isolierungs- und Kultivierungstechnik spielen in erster Linie Behandlung und Zustand des verwendeten biologischen Ausgangsmaterials eine Rolle. Hierunter fallen z.B. die Ischämiezeit nach Resektion, Geschlecht, Lebensstil und Krankheiten des Spenders, ebenso wie deren Vorbehandlung<sup>104</sup>. Eine breit gefächerte Analyse dieser Faktoren war angesichts der begrenzten Fallzahl, der starken Streuungen in der Koloniausbeute und der heterogenen Spenderpopulation wenig aufschlussreich. Abgesehen von dem deutlichen Zusammenhang mit dem Vorliegen einer Leberzirrhose bot lediglich der Bezug zum Spenderalter Raum für Spekulationen: Die beiden jungen Spender brachten unter den gesunden Lebern die höchste Menge an KBZ hervor. Das zeigt Parallelen zu Versuchen an Ratten, die ergaben, dass fetale oder neonatale Tiere mehr Vorläuferzellen als ältere aufwiesen. Dies könnte einerseits mit einem höheren Gehalt an Vorläuferzellen in jungen Individuen zusammenhängen, andererseits damit, dass die Regenerationsfähigkeit adulter Stammzellen und der Leber allgemein mit zunehmendem Alter schwindet<sup>127, 128</sup>. Letztlich können die Beobachtungen aufgrund der hohen Varianz und der geringen Probenzahl keinen Beleg, sondern nur einen vagen Hinweis darauf liefern, dass die Anzahl hepatischer Vorläuferzellen in der Leber mit dem Alter abnimmt.

Viral bedingte und nutritiv-toxische Leberzirrhosen stellen den überwältigenden Anteil transplantationsbedürftiger Lebererkrankungen weltweit. Nach Explantation und pathologischer Begutachtung wird das Gewebe für gewöhnlich als biologischer Abfall entsorgt. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit wäre es damit eine umso dankbarere Quelle für hepatische Vorläufer-

zellen. Für spätere therapeutische Zwecke kommen aus infektiologischen Gründen lediglich die ethyltoxischen Zirrhoselebern in Frage. Bei Bestätigung einer Stammzellidentität der KBZ wird der Regenerativen Medizin mit den vorliegenden Ergebnissen die zukünftige Verwertung zirrhotischer Lebern in Aussicht gestellt.

### 5.1.3 Weitere Limitationen

Neben dem Mangel an Selektivität für die KBZ lassen sich weitere Schwächen der Isolierung und ihrer Auswertung aufdecken.

Bei der Betrachtung der Grafiken zu den Koloniausbeuten fällt eine erhebliche Varianz der Werte ins Auge, die die Darstellung in Form von Boxplots erst notwendig machte. Die Ursachen hierfür sind vielfältig: z. B. Qualitätsunterschiede der Leberresektate, das breite Diagnosespektrum der Spender, die geringe Fallzahl, ein wechselhafter Kollagenase-Verdau, die fehleranfällige Fraktionierungsmethode oder Störfaktoren bei der Kultivierung. Der Einfluss einer Vielzahl von unberechenbaren Variablen macht eine detaillierte Analyse von Korrelationen nahezu unmöglich; es können somit nur Tendenzen abgeleitet werden, die besonders klar ersichtlich sind. Um den Erfolg von Isolierungen in Abhängigkeit diverser Parameter differenziert beurteilen zu können, ist eine größer angelegte Studie mit weitaus höheren Fallzahlen unumgänglich. Allerdings ist – wie auch in diesem Fall – die Knappheit der Spenderlebern der limitierende Faktor. Der geringe Probenumfang ließ zusammen mit der Streuung einen statistischen Signifikanztest nicht zu.

Ferner ist die lichtmikroskopische Erfassung der Kolonien ein methodisch kritikwürdiger Punkt. Die rein visuelle Kontrolle ist bei geringer Koloniedichte, aber hoher Zelldichte *a priori* ein Verfahren mit niedriger Sensitivität, das zudem mit einem hohen intra- und interindividuellen Beobachterfehler belastet ist. Es ist daher möglich, dass die reale Koloniausbeute kontinuierlich unterschätzt worden ist. Die angegebenen Werte sind somit als Mindestmaß aufzufassen.

Schließlich muss darauf hingewiesen werden, dass einige der berechneten Koloniausbeuten bei zirrhotischen Lebern extrapoliert worden sind. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass bei der Isolierung deutlich mehr zirrhotisches Lebergewebe zur Verfügung stand als gesundes. Folglich konnte aufgrund vordefinierter Zelldichte zur Aussaat nicht das komplette gewonnene Zellmaterial ausplattiert werden, da dem Aufwand Grenzen gesetzt werden mussten. Dementsprechend wurden die gezählten Kolonien zur ausgesäten Menge in Bezug gesetzt und die theoretisch mögliche Ausbeute pro Gramm Lebergewebe hochgerechnet.

Sollte sich durch weitere Indizien tatsächlich herausstellen, dass es sich bei den KBZ um hepatische Stamm- oder Progenitorzellen handelt, wäre somit die Arbeitshypothese des Projektes verifiziert. Die nachfolgenden Abschnitte widmen sich nunmehr der Eingrenzung der Zellentität anhand von Erkenntnissen aus Kultivierung und Phänotypisierung der KBZ.

## 5.2 Überleben und Wachstum unter serumfreien Konditionen

### 5.2.1 Einfluss des Serums auf die Kultivierung

Unter regelmäßiger Kontrolle der Koloniezahl wurde das Überleben der KBZ *in vitro* in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen untersucht. Es wurden zwei definierte Kultivierungsschemata, die auf der Verwendung eines serumfreien Spezialmediums basierten, miteinander verglichen. Dabei zeigte sich im Zeitverlauf eine auffällige Dynamik der Koloniedichte (Abb. 4.4).

Abgesehen von der unterschiedlichen Koloniedichte nach Aussaat fallen weitere markante Differenzen zwischen gesunden und zirrhotischen Resektaten auf. Während die Koloniedichte über den beobachteten Zeitraum bei gesunden Spendern nur geringfügigen Schwankungen ausgesetzt ist, lässt sich bei zirrhotischen Lebern in den ersten Tagen ein beträchtlicher Koloniezuwachs verzeichnen. Dieser ist bei den Isolaten, die nach Aussaat über Nacht in serumhaltiger Nährlösung (WME-Medium) inkubierten, stärker ausgeprägt, als bei solchen, die vollständig serumfrei gehalten wurden. Da nach einem Mediumwechsel am ersten Tag nach Aussaat eine Adhäsion weiterer KBZ weitestgehend ausgeschlossen werden kann, ist eine weitere Zunahme der Koloniezahl als Folge einer Zellproliferation aufzufassen; so ist es wahrscheinlich, dass vereinzelt adhärierte Zellen, die zuvor bei der Auszählung unentdeckt geblieben waren, zu koloniebildenden Einheiten heranwachsen und ab einer entsprechenden Größe visuell erfasst werden können. Die Konstanz der Koloniedichte bei gesunden Lebern im Gegensatz zu den zirrhotischen ist ergo als verminderte proliferative Tätigkeit in den ersten Tagen nach Isolierung zu deuten. In Anbetracht dessen, dass sich dieser Unterschied auch unter identischen Haltungsbedingungen zeigt, stellt sich die Frage nach der Ursache.

Einen Erklärungsansatz könnten die übrigen nicht-parenchymatösen Zellen liefern. Nicht selten wird die herausragende Rolle der inflammatorischen Reaktion bei der Einleitung regenerativer Mechanismen in der Leber betont<sup>61, 114</sup>. Insbesondere nach chronischer hepatischer Schädigung werden über Entzündungsmediatoren Effektorzellen wie z. B. Stellatzellen, Kupffer-Zellen und



Fibroblasten mobilisiert, die über parakrine Signale und Zell-Zell-Interaktionen u. a. Vorläuferzellen zur Zellteilung anregen<sup>117</sup>. Die unspezifische Fraktionierungsmethode mit der Konsequenz einer Mischkultur könnte bei der Isolierung aus zirrhotischen Lebern zur vermehrten Adhäsion dieser Effektorzellen beitragen. Es wäre vorstellbar, dass sie für eine erhöhte proliferative Aktivität der KBZ aus Leberzirrhosen verantwortlich sind. Dieser zusätzliche mitogene Stimulus fehlt bei den Isolaten aus gesunden Lebern gänzlich. Stattdessen vermuten einige Autoren sogar eine antiproliferative Wirkung kokultivierter adulter Hepatozyten<sup>129</sup>.

Als Grund für den stärkeren Anstieg der Koloniezahl nach Übernacht-Inkubation mit serumhaltiger Nährlösung werden vom Autor der Arbeit zwei Mechanismen favorisiert, die synergistisch wirken könnten. Zum Einen besteht die Möglichkeit, dass im Serum nicht näher definierte wachstumsfördernde Faktoren eine stärkere Proliferation der KBZ bewirken. Die Begünstigung der Proliferation ist der wesentliche Grund dafür, dass fetales Kälberserum grundlegender Bestandteil von Nährlösungen bei der Anzucht humaner Stammzellen ist<sup>130</sup>. Dass dieser mitogene Effekt auch nach dem Wechsel auf serumfreies Medium anhalten könnte – der fortwährende Anstieg der Koloniezahl lässt dies vermuten – erscheint wenig plausibel. Somit ist diese Option eher von untergeordneter Bedeutung. Naheliegender erscheint ein positiver Einfluss des Serums auf die Adhärenz der ausgesäten Zellen an den Beschichtungen. Folglich ist anzunehmen, dass unter WME-Medium von vornherein mehr Zellen der Suspension, darunter die KBZ, an die Kollagen- oder Hyaluronsäurematrix binden. Dafür spricht auch die beobachtete Zellarmut auf den Multiwell-Platten nach direkter Resuspension und Aussaat im serumfreien Mitaka-Medium. Dass hier dennoch eine Vielzahl von KBZ adhären und proliferieren kann, ist möglicherweise auf die spezielle Zusammensetzung des Mitaka-Mediums zurückzuführen. Daher begünstigt das Mitaka-Medium die Adhärenz der KBZ gegenüber den übrigen Zelltypen und hat dementsprechend eine selektierende Funktion inne.

Kolonien aus nicht-zirrhotischen Lebern ließen sich mit bis zu zwei Monaten deutlich länger anzüchten als ihre Gegenstücke aus zirrhotischen Resektaten (maximal 15 Tage). blieb die Koloniedichte bei gesunden Lebern über das beobachtete Zeitintervall etwa auf einem Niveau, so fiel sie bei zirrhotischen Resektaten nach kurzer Zeit rasch ab; besonders früh und drastisch war diese Regredienz bei komplett serumfrei gehaltenen Kolonien zu sehen. Es fiel auf, dass die Kulturplatten nach Isolierung aus gesunden Lebern durchgehend höhere Zelldichte hatten als Platten von zirrhotischen Spendern. Die komplett serumfrei kultivierten Platten waren in extremster Ausprägung fast vollständig von anderen Zelltypen befreit. Ein Zusammenhang des Überlebens der KBZ mit der Zelldichte in der Kultur wäre denkbar. Neben den Zell-Zell-Kontakten bestimmen auch Zytokine, die von umgebenden Zellen sezerniert werden, das

Überleben von HPCs in der Stammzellnische. Ein Beispiel hierfür ist das von Stellatzellen produzierte und im Mitaka-Medium enthaltene HGF<sup>10, 131</sup>. Der Wachstumsfaktor HGF hat neben seiner promotischen Wirkung auch einen hepatoprotektiven Effekt; an seinen Zielzellen, den Hepatozyten, induziert er antiapoptotische Proteine, die die Caspase-Kaskade regulieren<sup>2</sup>. Bezieht man diese Ergebnisse auf die Bedingungen *in vitro*, so lässt sich folgern, dass den isolierten KBZ mit zunehmendem Grad an Reinheit überlebensnotwendige Signale fehlen, die sonst von koinizierten Zelltypen bereitgestellt werden. Da die Zellkulturen aus gesunden Lebern zahlreiche Hepatozyten aufweisen, ist nicht auszuschließen, dass diese als nützliche Signalgeber fungieren.

Die höhere Koloniewasbeute aus zirrhotischen Spenderlebern wurde offenbar mit einer geringeren Überlebenszeit erkaufte. Das Experiment lässt vermuten, dass das fetale Kälberserum bedeutend in Adhäsion und Proliferation der isolierten Zellpopulation involviert ist. Ein vollständiger Verzicht auf das Serum wäre derzeit nur mit erheblichen Einbußen verbunden. Einen Ausweg könnte die Verwendung von humanem autologen Serum bieten<sup>132</sup>. Um das verwendete Medium vollends von tierischen Proteinen zu befreien, könnte das bovine Serumalbumin (BSA) durch humanes rekombinantes Albumin substituiert werden. Das Überleben der KBZ wird offenbar durch das Vorhandensein kokultivierter Zellen wie z. B. adulter Hepatozyten gesichert. Um bei selektiver Adhäsion der KBZ unter vollständig serumfreien Konditionen dennoch eine langfristige Anzucht zu erreichen, wird die Verwendung eines sog. konditionierten Mediums vorgeschlagen. Der Leitgedanke dahinter besteht darin, der Reinkultur die fürs Überleben essentiellen Stoffe zukommen zu lassen, indem die Hepatozyten separat kultiviert und das Medium anschließend auf die KBZ übertragen wird.

### 5.2.2 Spontane und induzierte Expansion

Da die zeitliche Dynamik der Koloniedichte nur bedingte Aussagekraft für das Wachstumsverhalten der KBZ *in vitro* besitzt, erfolgte die Beurteilung der spontanen mitotischen Aktivität anhand direkter Beobachtung ausgewählter Kolonien mittels Zeitrafferaufnahmen und lichtmikroskopischer Bildersequenzen.

Das Auftreten zahlreicher Mitosen im Zeitraffer belegt eine lebhafte Teilungsaktivität bei ausgewählten Kolonien aus gesunden Lebern. Chronologisch aneinandergereihte Fotoserien, die Kolonien aus gesunder wie zirrhotischer Leber zeigen, weisen auf eine Zunahme in Größe und

Zellzahl hin. Auch dies ist als Indiz für das Auftreten von Mitosen aufzufassen. Bei der Interpretation der beobachteten Replikationsrate sei Vorsicht geboten, da sie sowohl eine intrinsische Eigenschaft der Zellen als auch einen primär kultivierungsabhängigen Parameter darstellt. Bei Sasaki et al., deren Anzuchtbedingungen den unsrigen am ähnlichsten sind, geht aus der Analyse der Wachstumsdynamik eine Verdopplungszeit der SH-Kolonien von initial etwa 72 Stunden hervor<sup>69</sup>. Dies entspricht grob der Verdopplungszeit der isolierten KBZ, die auf 65 Stunden geschätzt wurde. Schmelzer et al. berichten gar von einer Verdopplungszeit der hHpSC-Kolonien von zeitweise unter 24 Stunden<sup>73</sup>. Die Proliferationskapazität der KBZ bleibt weit dahinter zurück.

Die Tatsache, dass die Dokumentation des Koloniewachstums nur in vereinzelten Fällen gelang, führt zu der Annahme, dass nur ein Bruchteil der isolierten Population tatsächlich proliferiert. Das optimale Zeitfenster für die Beobachtung der Mitosen liegt scheinbar in den ersten Tagen nach der Aussaat. Dies trifft in besonderem Maße auf die Kolonien aus zirrhotischen Lebern zu; hier wird in den Bildsequenzen die stärkste Expansion in der Zeit unmittelbar nach Aussaat verzeichnet. Dies ist im Einklang mit den Schilderungen des vorangegangenen Abschnittes. Da im Zeitraffer nur Kolonien gesunder Lebern als Referenz zur Verfügung standen, ist davon auszugehen, dass Kolonien zirrhotischer Lebern weitaus mehr Mitosen durchlaufen.

Nach einer gewissen Dauer sistiert das Koloniewachstum spontan. Dieser Zeitpunkt ist bei Kolonien zirrhotischer Lebern früher erreicht als bei gesunden; hier konnte im Einzelfall bis zum 25. Tag nach Aussaat von einer langsamen Größenzunahme gesprochen werden. Jung et al. kamen zu dem Schluss, dass sterbende Hepatozyten Mediatoren produzieren, die das Wachstum von Progenitorzellen stimulieren<sup>133</sup>. Es wäre denkbar, dass die progressive Apoptose adhärierter reifer Hepatozyten in der Zellkultur als proliferativer Reiz fungiert. Bei der Isolierung aus gesunden Lebern adhäriert eine größere Zahl an Hepatozyten als bei zirrhotischen Lebern; da die serumfreie Kultivierung früher oder später unweigerlich zum Zelltod der Hepatozyten führt, bleiben die KBZ hier auch länger teilungsaktiv. Die Gesamtzellmasse an KBZ ist bei Sistieren des Wachstums insgesamt als äußerst gering einzustufen. Um die Charakterisierung effizienter zu gestalten, bedarf es einer weiteren Expansion der Zellen.

Mit dem geglückten Nachweis spontaner Proliferationen unter Serumfreiheit wurde im nächsten Schritt der Versuch unternommen, die KBZ aktiv zu propagieren. Nach mehreren Transferbemühungen adhärierte eine Kolonie aus gesunder Leber auf einem Feederlayer aus humanen Vorhautfibroblasten, die als Ammenzellen fungieren sollten. Über zwei Wochen konnte ein Wachstum der zuvor statischen Kolonie verzeichnet werden. Die Anwendung von Feederzellen hat sich in der Stammzellforschung etabliert. Durch *in vitro* Simulation der Mikroumgebung in

der Stammzellnische sollen Überleben und Wachstum von Stammzellen gesteuert werden<sup>104</sup>. Humane Vorhautfibroblasten spiegeln das artifizielle Korrelat zu mesenchymalen Zellen in der hepatischen Nische wider. Diese aktivieren durch Zell-Zell-Kontakte oder indirekt durch Zytokine eine intrazelluläre Signalkaskade in den Vorläuferzellen, die eine proliferative Antwort triggert<sup>134</sup>. Analog dazu lässt sich auch die promotische Wirkung der Feederzellen auf die KBZ im vorliegenden Experiment erklären.

Die größte Hürde bei dieser Vorgehensweise scheint die unzureichende Adhärenz auf dem Feederlayer zu sein; die niedrige Erfolgsquote für die Übertragung der Kolonien ist ein Beleg dafür. Erschwerend kam hinzu, dass KBZ wenig resistent gegenüber einer Trypsinierung waren und zur Passage folglich die methodisch aufwändigere Mikrodissektion in Anspruch genommen werden musste. Dies bereitete insbesondere bei den kleinen Kolonien aus zirrhatischen Lebern Probleme. Das Gelingen in zwei Fällen mutet dabei eher zufällig an. Will man zukünftig frustrane Expansionsversuche dieser Art vermeiden, so wäre es hilfreich, vor dem Transfer die Gesamtzellmasse der KBZ zu erhöhen, adhärenzfördernde Faktoren zu identifizieren oder auf andere Methoden der Propagation auszuweichen, wie beispielsweise dem Zusatz potentieller löslicher Mitogene.

Der Proliferationsnachweis durch Bilder bietet eine ungenügende Vergleichsbasis für erhobene Daten anderer Autoren; er sollte durch weitere Methoden ergänzt werden. Für eine präzisere Quantifizierung des Zellwachstums sollte in Zukunft auf geeignete Proliferationstests (z. B. XTT, alamarBlue®) oder – nach entsprechend gut definiertem Phänotyp – auf automatisierte Zellzählungen zurückgegriffen werden.

Es konnte mit Erfolg gezeigt werden, dass die koloniebildende Zellpopulation dazu in der Lage ist, unter Serumfreiheit zu proliferieren. Die beobachtete Replikationsrate ist jedoch als vergleichsweise mäßig einzustufen. Darüber hinaus war es möglich, die KBZ mittels mesenchymaler Ammenzellen zu propagieren. Trotz methodischer Defizite, die dieses Verfahren aktuell noch ineffizient machen, eröffnet dies eine vielversprechende Perspektive für angehende Versuche der Expansion.

## 5.3 Die Identität des koloniebildenden Zelltyps

### 5.3.1 Betrachtungen zur Zellmorphologie

Die Morphologie der KBZ wurde lichtmikroskopisch festgehalten und analysiert. Die Untersuchungen konzentrierten sich dabei primär auf Merkmale, die in der Literatur typischerweise hepatischen Vorläuferzellen zugeschrieben werden. Des Weiteren wurde auf Charakteristika sämtlicher in der Leber vertretenen Zelltypen geachtet, ebenso wie auf das Auftreten von Zeichen, die über den Reifungsgrad der Zellen Aufschluss geben.

Die ermittelte Zellgröße von 6-12 µm bewegt sich mit eindrucksvoller Präzision in dem Rahmen, der von anderen humanen Vorläuferzellkandidaten wie *Small Hepatocytes*, humanen Hepatischen Stammzellen (hHpSCs) und Hepatoblasten vorgegeben wurde<sup>69, 129</sup>. Sie sind damit deutlich kleiner als kokultivierte adulte Hepatozyten. Einige Autoren sehen darin für eventuelle Zelltransplantationen einen Vorteil gegenüber Hepatozyten, da dadurch die Wahrscheinlichkeit eines Hängenbleibens in den hepatischen Sinusoiden verringert und damit eine verbesserte Implantation in der Leber sichergestellt sein soll<sup>135</sup>. Auch weitere strukturelle Merkmale der KBZ zeigen Analogien zu anderen hepatischen Stamm- oder Progenitorzellen. Dazu gehören vor allem die hohe Kern-Plasma-Relation, die fehlende Polarität und die Einkernigkeit. Abgesehen von letzterer sind diese Eigenschaften als Zeichen eines niedrigen Differenzierungsgrades zu werten. Ein ovaler Zellkern wird zudem häufig in Verbindung mit den Ovalzellen aus Nagetierlebern genannt<sup>7</sup>. Das regelmäßig beobachtete Nucleolenpaar könnte auf eine erhöhte Transkriptionsrate im Zellkern der KBZ hindeuten, möglicherweise als Spiegel der mitotischen Aktivität. Einen genaueren Einblick auf zellulärer Ebene könnte allerdings nur eine ultrastrukturelle Betrachtung mittels Elektronenmikroskopie geben.

Beim Vergleich der Kolonien aus gesunden und zirrhotischen Lebern ließen sich lediglich Unterschiede in der Kolonieform, nicht in der Zellmorphologie feststellen. So wiesen überwiegend Kolonien aus gesunder Leber die klar abgegrenzte, rundliche Kolonieformation auf, die von hHpSCs und *Small Hepatocytes* her bekannt ist. Kolonien aus zirrhotischen Lebern waren weitaus vielgestaltiger. Eine Erklärung hierfür könnte in der relativen Zellarmut in diesen Kulturen liegen, die die räumliche Entfaltung der Kolonien nicht einschränkt. Einige Formationen zeigten erstaunliche Ähnlichkeiten zum säulenartigen Aufbau von Kolonien humaner Hepatoblasten<sup>73</sup>.

In wenigen Kolonien aus zirrhotischen Lebern wurde im Laufe der Anzucht eine Veränderung der Zellmorphologie bemerkt; dabei konnte in erster Linie eine erhebliche Zunahme der Zellgröße mit Verminderung der Kern-Plasma-Relation verzeichnet werden. Nach einiger Zeit in diesem Zustand setzte die Apoptose ein. Es wäre denkbar, dass sich hier eine spontane Differenzierung der KBZ ereignet hat, ein Phänomen, das bereits aus der Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen bekannt ist. Sollte dies der Fall gewesen sein, muss es sich um einen unvollständigen Prozess gehandelt haben; es ließen sich weder weitere morphologische Eigenschaften von Hepatozyten oder Cholangiozyten wie z. B. Polarität, noch Anzeichen für eine synthetische Aktivität in Form von zytoplasmatischen Granula finden. Letzte Gewissheit darüber hätte nur eine funktionelle Charakterisierung liefern können. Es kann nur gemutmaßt werden, warum dies ausschließlich bei Isolierungen aus zirrhotischen Lebern aufgetreten ist; möglicherweise tragen die zahlreichen kokultivierten Zelltypen bei gesunder Leber dazu bei, die KBZ in undifferenzierten Zustand zu halten, vergleichbar mit den mesenchymalen Zellen der Stammzellnische<sup>134</sup>. Bei den Isolierungen aus zirrhotischen Lebern entfiel dieser Effekt aufgrund der größeren Reinheit der Zellkultur.

Die morphologische Begutachtung deckt eine Vielzahl von Parallelen der KBZ zu anderen in der Literatur beschriebenen, adulten Vorläuferzellen auf. Trotz einzelner Tendenzen ist eine eindeutige Zuordnung zu einer dieser Gruppen ohne Berücksichtigung des Immunphänotyps nicht möglich. Ferner gibt es Anhaltspunkte dafür, dass einzelne Kolonien in der Kultur spontan differenziert sind.

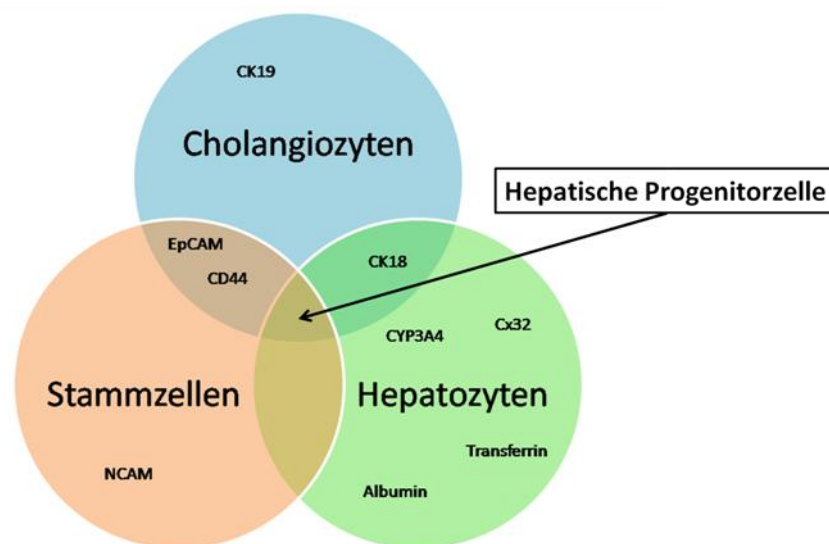
### 5.3.2 Das Expressionsprofil im Kontext der Fachliteratur

Zur Eingrenzung des Phänotyps wurden neben der Mikroskopie auch molekularbiologische und immunologische Verfahren herangezogen. Mittels RT-PCR und Immunfluoreszenzfärbungen wurden die KBZ hinsichtlich der Expression ausgewählter Marker getestet. Das ermittelte Expressionsmuster sollte hinreichende Klarheit über die Identität des Zelltyps schaffen.

Das Markerpanel umfasste überwiegend Antigene, die in der Literatur zu Leberstammzellen häufig analysiert werden. Sie lassen sich grob als hepatozyten-spezifische (Albumin, Transferrin, HNF-4 $\alpha$ , Cytochrom-p450-Enzyme, Connexin 32), cholangiozyten-spezifische (CK19) und stammzell-spezifische (AFP, NCAM, EpCAM) Marker klassifizieren, wobei EpCAM trotz Prävalenz für Stammzellen auch in biliärem Epithel präsent ist. Darüber hinaus wurden

epitheliale (CK18), mesenchymale (Vimentin, CD90) und vermeintliche Progenitorzellmarker (OV-6, CD44v6, Annexin A3) in den Kanon aufgenommen. CD90 diene überdies dem Ausschluss von Stellatzellen<sup>109</sup>.

Wird davon ausgegangen, dass die Kolonien aus gesunder und zirrhotischer Leber identisch sind, so kann in Hinblick auf deren Gen- und Antigenexpression ein Profil konstatiert werden, das sowohl Marker reifer Hepatozyten und Cholangiozyten als auch Stammzellmarker beinhaltet (Abb. 5.1). Dieser intermediäre Phänotyp ist charakteristisch für hepatische Progenitorzellen und spiegelt deren oftmals postulierte Mittelstellung zwischen undifferenzierten Stammzellen und differenzierten, funktionellen Leberzellen wider. Ferner stützt der positive Nachweis der potentiellen Progenitorzellmarker CD44v6 und Annexin A3 diese These<sup>72, 136</sup>.



**Abbildung 5.1** Der intermediäre Phänotyp der isolierten Zellpopulation. Die Darstellung führt wichtige, von den KBZ exprimierte Antigene auf und ordnet sie in ihren jeweiligen Kontext ein. Es wird damit verdeutlicht, dass die KBZ Marker von Stammzellen, Cholangiozyten und Hepatozyten in sich vereinen.

Für einen metaanalytischen Vergleich der KBZ mit anderen hepatischen Vorläuferzellen ist eine differenziertere Betrachtung der Expression vonnöten (Tabelle 5.1). Da die Kulturbedingungen nachweislich die Antigenität und Genexpression der Zellen in Kultur beeinflussen, sei als Referenz primär auf solche humane Progenitorzellen hingewiesen, die ebenfalls serumfrei angezüchtet worden sind (SHs, Hepatoblasten, hHpSCs). Abgesehen vom wichtigsten tierischen Vertreter der Progenitorzellen, den Ovalzellen, wurde die Gegenüberstellung noch durch *adult-derived human liver stem/progenitor cells* (ADHLSCs), Hepatozyten und Cholangiozyten vervollständigt, deren Daten allerdings aus serumhaltigen Kulturen stammen. Ein Vergleich ist daher nur unter Vorbehalt möglich; hier sollte der Phänotyp eher als Idee denn als Dogma verstanden werden.

**Tabelle 5.1 Synopsis der exprimierten Marker.** Gegenüberstellung einzelner Marker der KBZ mit denen anderer intrahepatischer Progenitorzellen sowie Hepatozyten und Cholangiozyten. KBZ: koloniebildende Zellen, SH: *Small Hepatocyte*, hHpSC: humane Hepatische Stammzelle, ADHLSC: *adult-derived human liver stem/progenitor cell*, o.A.: ohne Angaben. Bei der Zusammentragung der Angaben wurde größtenteils auf eine Übersichtsarbeit von Strick-Marchand et al. zurückgegriffen<sup>137</sup>. Die übrigen Referenzen sind beim jeweiligen Zelltyp angeführt.

	KBZ	Oval cell 109, 129, 138, 139	SH 69, 72, 140	Hepatoblast 74, 129	hHpSC 74, 129	ADHLSC 75, 76	Hepatozyt 69, 72, 74, 129, 141	Cholangiozyt 142-144
Actin	+	+	+	+	+	+	+	+
Albumin	+	+	+	+	+	+	+	-
Transferrin	+	+	+	+	+	o.A.	+	-
CK18	+	+	+	+	+	-	+	+
CK19	+	+	+	+	+	-	-	+
CYP3A4	+/-	-	+	-	-	+	+	-
CYP1A2	-	-	+ (Ratte)	o.A.	o.A.	+	+	-
Cx 32	+	-	+ (Ratte)	+	+	o.A.	+	-
AFP	-	+	+	+	-	+	+	-
EpCAM	+	+	+	+	+	o.A.	-	+
Annexin A3	+	o.A.	+ (Ratte)	o.A.	o.A.	o.A.	-	o.A.
OV-6	-	+	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.	-	+
CD 44	+	+	+	+	+	+	-	+



Die Übersicht untermauert die Nähe der KBZ zu den von Schmelzer et al. isolierten Hepatoblasten und humanen Hepatischen Stammzellen (hHpSCs); bei beiden Zelltypen sind die wenigsten Abweichungen vom Expressionsprofil der KBZ ersichtlich<sup>74</sup>. Die hHpSCs stellen unter den untersuchten Zelltypen den einzigen, der zusammen mit den KBZ kein AFP exprimiert. Die Genexpression von AFP, dem archetypischen Indikator für undifferenzierte Zellen der Leber, nimmt mit höherem Reifegrad hepatischer Zellen ab. Dies kann darauf hinweisen, dass die KBZ ebenso wie die hHpSCs in der Entwicklungslinie der Leberzellen im Vergleich zu den übrigen Progenitorzellen als weiter differenziert einzuordnen sind. Damit würden sie womöglich eine geringere Plastizität aufweisen. Paradoxiere Weise sehen die Verfasser der Studien die Hepatoblasten als Folgegeneration der hHpSCs an. In Bezug auf den Nachweis von Markern reifer Hepatozyten wie Connexin 32 und Transferrin zeigen die KBZ eher Gemeinsamkeiten mit Hepatoblasten. Letztendlich kann eine absolute Übereinstimmung der Phänotypen nicht bestätigt werden; dies kann einerseits auf die unterschiedliche Isolierungs- und Kultivierungsmethodik von Schmelzer et al. zurückzuführen sein oder der Tatsache geschuldet sein, dass es sich um verschiedene Vorläuferzellen handelt. Der Verfasser der Arbeit vertritt jedoch eine dritte Hypothese: Zusammen mit den offensichtlichen Ähnlichkeiten in Morphologie und Klonalität beider Zelltypen erhärtet das Expressionsprofil den Verdacht einer Verwandtschaft von KBZ sowohl mit Hepatoblasten als auch hHpSCs. Diese Parallelen ließen sich miteinander vereinen, wenn die KBZ einem Reifestadium entsprächen, das zwischen hHpSCs und Hepatoblasten anzusiedeln wäre.

Obwohl der Versuchsaufbau der Isolierung humaner *Small Hepatocytes* nachempfunden worden ist, weicht dessen Effizienz deutlich von den Angaben der Arbeitsgruppe Mitakas ab. Bei vergleichbarem Expansionsverhalten exprimieren *Small Hepatocytes* in jedem Fall AFP und eine Vielzahl von Cytochrom-p450-Enzymen. Dies konnte im Falle der KBZ für AFP nicht und für die CYPs nur inkonstant gezeigt werden. Nach Meinung des Verfassers handelt es sich bei *Small Hepatocytes* folglich um eine andere Zellentität als die der KBZ.

Abgesehen von einzelnen positiven hepatozellulären Markern sowie CD44 sind keinerlei Analogien der KBZ zu ADHLSCs ersichtlich. Wird zudem berücksichtigt, dass die KBZ weder das für ADHLSCs so charakteristische fibroblastenartige Erscheinungsbild noch mesenchymale Marker aufweisen, scheint eine Übereinstimmung der Zelltypen ausgeschlossen. Ob oder inwiefern die ADHLSCs im differenzierten Zustand den KBZ gleichen, lässt sich anhand der Angaben in der Literatur bisher nicht ableiten. Es deutet jedoch einiges darauf hin, dass es sich bei den differenzierten ADHLSCs mitnichten um Zellen mit phänotypischer Zwitterstellung handelt, sondern vielmehr um nahezu ausgereifte Hepatozyten.

Neben anderen Differenzen war der fehlende Nachweis des spezifischen Ovalzellmarkers OV-6 das ausschlaggebende Kriterium für eine Abgrenzung zu den Vorläufern aus Nagetierlebern. Eine direkte Extrapolation des tierischen Phänotyps auf humane Progenitorzellen erscheint ebenso wie die Anwendung von OV-6 für deren Isolierung unzulässig.

Der Vergleich der Expression auf RNA- und Proteinebene erfolgte zwischen Kolonien aus gesunden und zirrhotischen Lebern nur auf Grundlage weniger Marker. Dies war in erster Linie auf das begrenzte Zellmaterial in Kombination mit der erschwerten RNA-Extraktion zurückzuführen. So diente lediglich das Vorkommen von Albumin, Transferrin, CYP3A4 (RT-PCR) und Annexin A3 (Immunfluoreszenzfärbung) als Vergleichsbasis. Hierbei stimmten die Marker in beiden Spenderpopulationen bis auf CYP3A4 überein; im Gegensatz zur zirrhotischen Leber gelang der Nachweis in Kolonien gesunder Lebern nicht. Es könnte sich hierbei allerdings um ein Artefakt handeln, das dadurch zustande kommt, dass die RNA aus gesunden und zirrhotischen Spendern zu Zeitpunkten gewonnen wurde, die weit auseinanderlagen. Eine mögliche zeitliche Dynamik der Expression würde dabei vernachlässigt. So wäre es denkbar, dass bei den KBZ im Laufe der Kultivierung die Genaktivität für die Cytochrom-p450-Enzyme abnimmt, in Analogie zu adulten Hepatozyten, die *in vitro* dedifferenzieren. Trotz dieser Einschränkung sprechen die übrigen Marker sowie die morphologischen Befunde dafür, dass die KBZ aus gesunden und zirrhotischen Lebern auf einem einheitlichen Zelltyp basieren.

Einschränkend sei an dieser Stelle auf die inhomogenen Fluoreszenzmuster der Kolonien bei der Färbung von CK18 und CK19 hingewiesen. Sie können ein Indiz für eine phänotypische Instabilität innerhalb der Kolonie darstellen, was zur Folge hat, dass vor allem die Expression von CK18 nur mit Vorsicht als absolut zu interpretieren ist. Mit CK18 als epithelialen Marker stellt sich die Frage, ob die Kolonien etwa einen Wandel in Form einer mesenchymalen-epithelialen/epithelialen-mesenchymalen Transition durchmachen. Einzelne Autoren vermuten, dass HPCs kein eigenständiger Zelltyp sind, sondern vielmehr als Produkt aus einer solchen Reaktion hervorgehen<sup>145</sup>. Der fehlende Nachweis von Vimentin und CD90, zweier mesenchymaler Marker, spricht in unserem Experiment dagegen. Es ist eher anzunehmen, dass eine spontane Reifung innerhalb der Kolonien für dieses Phänomen verantwortlich war.

In Zusammenschau mit den Erkenntnissen aus morphologischer Untersuchung, Kultivierung, Propagation und Expressionsanalyse wird gefolgert, dass es sich bei dem isolierten, koloniebildenden Zelltyp um hepatische Progenitorzellen handelt. Sie werden nachfolgend als solche bezeichnet.

### 5.3.3 Überlegungen zu einer möglichen neoplastischen Identität

Den isolierten KBZ könnte aufgrund einer Reihe von Anhaltspunkten unterstellt werden, in Wahrheit eine Tumorzellentität zu sein. Ein Argument dafür ist bereits in der Auswahl der Spender zu finden. In den wenigsten der Fälle konnte *a priori* von einer absoluten Tumorfreiheit der Leberproben, die für die Isolierung verwendet wurden, ausgegangen werden. Bei der Mehrzahl der Patienten, bei denen vermeintlich gesunde Teilresektate akquiriert wurden, stand eine neoplastische Grunddiagnose im Raum. Trotz eines großzügigen Sicherheitsabstandes ist eine Mikroinfiltration der Herde oder ihrer Filiae stets möglich. Darüber hinaus stellen zirrhotische Lebern per se den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung hepatozellulärer Karzinome dar. Die unkomplizierte Anzucht und Expansion *in vitro* ist ein Charakteristikum, das die Kultivierung etablierter Tumorzelllinien auszeichnet. Eine hohe Kern-Plasma-Relation dient dem Pathologen als wichtiges Entscheidungskriterium bei der Beurteilung von Geweben mit Tumorverdacht. Schließlich können Stammzellmarker wie EpCAM und NCAM auch regelmäßig in schlecht differenzierten Tumorgeweben nachgewiesen werden<sup>146, 147</sup>.

Es mutet äußerst unwahrscheinlich an, dass bei jeder der 23 Isolierungen mehrere Kolonien gleichartiger Zellen isoliert wurden, die auf einer Neoplasie beruhen. Ferner gelang die Isolierung auch bei Spendern mit benigner Grunddiagnose (Choledochuszyste), deren Kolonien mitunter eine höhere Proliferationsrate aufweisen konnte, als eine vergleichbare Kolonie bei maligner Grunderkrankung. Die Hinweise auf eine mögliche spontane Differenzierung der Zellen *in vitro* spiegeln ein für Tumoren untypisches Verhalten wider; es stünde im Kontrast zur entdifferenzierten Krebszelle. Die fehlende Expression von AFP bei den KBZ spricht zumindest gegen das Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms.

Der Autor der vorliegenden Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass eine maligne Identität der KBZ vehement anzuzweifeln ist, jedoch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Da es weder eindeutige Kriterien noch spezifische Marker für Tumorzellen gibt, können in letzter Instanz nur Transplantationsversuche am Tier mit der Beobachtung eventueller Tumorbildung Aufschluss über das neoplastische Potential der KBZ geben.

Dass hepatische Progenitorzellen und Tumorzellen durchaus in Bezug zueinander stehen könnten, wird in der Theorie der sog. Krebsstammzelle impliziert<sup>148</sup>. Sie geht davon aus, dass besonders aggressive Malignome zum Teil von einer klonalen Ursprungszelle unterhalten werden, die aus entarteten Stamm- oder Progenitorzellen hervorgegangen sind. Dafür spricht z.B. die häufig beobachtete Koinzidenz von Ovalzellen in lokaler Nähe hepatozellulärer Karzinome<sup>116</sup>.

Neben der Aktivierung hepatischer Progenitorzellen ist auch das Auftreten von Neoplasien mit Zuständen chronischer Gewebeschädigung assoziiert<sup>149</sup>. Damit würden Erkenntnisse über den Phänotyp hepatischer Progenitorzellen in einem neuen Licht dastehen: Ließen sich spezifische Progenitorzellmarker identifizieren, so könnten die Vorläuferzellen vor ihrer Entartung oder gar die Krebsstammzellen selbst gezielt angesteuert werden und der Leberonkologie neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen.

#### 5.3.4 Limitationen der Charakterisierung

Dem Umfang der molekularbiologischen und immunologischen Analysen wurde vornehmlich durch die geringe Gesamtzellmasse der humanen Progenitorzellen Grenzen gesetzt. Auch die Heterogenität der Zellkultur mit der daraus resultierenden erschwerten Extraktion reiner RNA führte dazu, dass für die RT-PCR nur wenig Probenmaterial zur Verfügung stand. Daher wurden die Methoden eher komplementär als einander bestätigend eingesetzt, wie es *lege artis* gehandhabt wird. So musste die Auswahl an Markern wohlüberlegt auf ein notwendiges Minimum zurückgeschraubt werden; weitere Stammzellmarker wie CD133 oder CD117 (c-kit), andere Progenitorzellmarker, Proliferationsmarker (Ki-67) oder die Expression bisher unbekannter Antigene konnten deshalb nicht ausgetestet werden. Da sich auf diese Weise kein spezifischer Marker für die HPCs aufdecken lässt, scheint unter Berücksichtigung der Expressionsprofile am ehesten die Kombination der beiden Stammzellmarker EpCAM und AFP für immunselektive Verfahren geeignet. Positivität für EpCAM bei gleichzeitigem Mangel an AFP ist abgesehen von den HPCs nur noch für Hepatoblasten kennzeichnend. Es sollte als primäres Nahziel die Optimierung der Isolierungstechnik und die Expansion der HPCs definiert werden, um adäquate Mengen für Methoden wie Microarray und Proteomik gewinnen zu können<sup>104</sup>. Erst mit diesem Schritt wäre die Identifizierung spezifischer HPC-Antigene zu erwarten.

Die Knappheit des Zellmaterials sowie der RNA verhinderte zusammen mit der schweren Kultivierbarkeit der HPCs eine differenziertere Betrachtung der zeitlichen Dynamik der Expression. Idealerweise sollte die Charakterisierung der Zellen zu festgelegten Zeitpunkten in der Zellkultur erfolgen, um dieser Möglichkeit gerecht zu werden und den Phänotyp der HPCs exakter einordnen zu können. So ließen sich auch eventuelle Einflüsse auf Fluktuationen der mitotischen Aktivität oder Differenzierung der HPCs eruieren.

Abgesehen von den Parametern Kultivierung und Zeit hängt der Phänotyp der HPCs aller Wahrscheinlichkeit nach von weiteren Faktoren ab. So haben beispielsweise auch die Art des Verdaus sowie Eigenschaften von Lebergewebe und Donor Auswirkungen auf die Antigenität

der Zellen<sup>14, 150</sup>. Die heterogene Spenderpopulation ist eine Schwäche der Arbeit, aber angesichts des Mangels an humanem Lebergewebe ein unvermeidbarer Umstand.

Kritik lässt sich auch an der Art der Phänotypisierung selbst üben. So sollte die morphologische Beurteilung der HPCs mittels Lichtmikroskopie durch aussagekräftigere ultrastrukturelle Aufnahmen erweitert werden. Ferner ist eine funktionelle Charakterisierung praktisch nicht präsent; lediglich die Beobachtungen zur Proliferationskapazität ist im weitesten Sinne als eine solche zu werten. Die Analyse der HPCs hinsichtlich leberspezifischer Syntheseleistungen und der Fähigkeit zur Biotransformation ist für einen potentiellen therapeutischen Einsatz unumgänglich. Im vorliegenden Experiment stimmte die niedrige Zellmasse wenig zuversichtlich für einen Nachweis dieser Funktionen. Wäre die Differenzierung der HPCs Anspruch dieser Arbeit gewesen, so hätte auch der Beweis der Bipotenz einen entscheidenden Hinweis auf die Identität der HPCs liefern können.

#### **5.4 Hinweise zur Lokalisation hepatischer Progenitorzellen**

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wo HPCs *in vivo* lokalisiert sein könnten, wurden mikroskopische Schnitte aus Lebern mit ethyltoxisch bedingter Zirrhose angefertigt und mittels Antikörpern, die gegen CD44v6 und CD133 gerichtet waren, angefärbt. Bei CD44v6 wurden Fluoreszenzsignale aufgezeichnet, die disseminierte intralobuläre Inseln hervorhoben, während sie bei CD133 verstärkt auf die Periportalfelder und Interlobärsepten konzentriert waren.

Geht man von einer Spezifität des vermeintlichen Progenitorzellmarkers CD44v6 für HPCs aus, so könnte man das beobachtete Fluoreszenzmuster als Anhaltspunkt für diffuse, intralobulär gelegene Stammzellnischen interpretieren. Kuwahara et al. beschrieben in markierungsbasierten Abstammungsstudien, dass die Leberregeneration bei chronischer Schädigung auch von intralobulären Gallengängen, periduktalen Zellen und peribiliären Hepatozyten ausginge<sup>102</sup>. Der Autor hält dies für zu weit hergeholt, da er an der Spezifität des Markers zweifelt. Die Propagierung der Spleißvariante CD44v6 als kennzeichnendes Antigen für hepatische Progenitorzellen basiert nur auf vereinzelt Studien<sup>136</sup>. Ferner wird der Hyaluronsäurerezeptor u. a. auch von Cholangiozyten exprimiert<sup>144</sup>. Die signalintensiven Bereiche in den Immunfärbungen könnten ebenso Zellcluster aus Cholangiozyten darstellen.

Einen breiteren Zuspruch erntet die These, dass die Stammzellnische in den anatomisch besser definierten Hering-Kanälchen aufzufinden ist. CD133 ist ein Marker, der u. a. seit geraumer Zeit für die Isolierung hämatopoetischer Stammzellen eingesetzt wird und bei einigen hepatischen

Progenitorzellen aus Mensch und Tier nachgewiesen werden konnte<sup>124</sup>. Das Färbeverhalten von CD133 spricht für eine Anreicherung hepatischer Stamm- oder Progenitorzellen in den periportal und interlobulären Bindegewebssepten. Die Hering-Kanälchen liegen in enger topographischer Nähe zu diesen Lokalisationen. Damit ist das Ergebnis mit der gängigen Vermutung einer Stammzellnische in den Hering-Kanälchen vereinbar. Unglücklicherweise wurde die Expression von CD133 bei den isolierten HPCs im vorliegenden Versuch nicht untersucht. Daher kann der Ursprung der HPCs in den Hering-Kanälchen nicht belegt, sondern nur darüber spekuliert werden.

## 5.5 Eignung der Progenitorzellen für regenerative Verfahren

Dan et al. erörterten in einer ihrer Publikationen, welche Eigenschaften ein Vorläuferzelltyp idealerweise aufweisen sollte, um beim Einsatz in regenerativen Verfahren wie Zelltherapie oder BAL optimale Ergebnisse zu erzielen<sup>36</sup>; dabei wurde eine Reihe von Forderungen an die Zelle formuliert (Tab. 5.2).

**Tabelle 5.2** Forderungen an die ideale Vorläuferzelle der Leber. HPC: isolierte hepatische Progenitorzellen.

Eigenschaft	HPC
Leicht verfügbar ohne ethische Vorbehalte	✓
Reproduzierbare, verlässliche und einfache Isolierungstechnik	✓
Definitive immunphänotypische Handschrift, z.B. ein einzigartiger Oberflächenmarker	✗
Fähigkeit zum Wachstum <i>in vitro</i>	✓
Erlaubt die Propagation	✓
Kann kryokonserviert werden mit hoher Vitalität nach dem Auftauen	?
Fähigkeit, zu funktionierenden Hepatozyten und Cholangiozyten zu differenzieren (Bipotenz)	?
Funktionelle Integration bei <i>in vivo</i> -Studien ohne Zellfusion oder horizontalen Gentransfer	?
Hohes Repopulationspotential in Transplantationsstudien	?
Nachweisbarer therapeutischer Effekt mit klinischer Relevanz in Schädigungs-Modellen	?
Keine Kanzerogenität	?

Der Blick auf die Übersicht verdeutlicht, dass die isolierten HPCs in einigen entscheidenden Punkten den gestellten Ansprüchen genügen. Ergänzend dazu ist hier auch die Möglichkeit der serumfreien Kultivierung als begünstigender Faktor für therapeutische Zwecke zu erwähnen,

obwohl die Überlebenszeit der Zellen unter diesen Voraussetzungen aktuell noch vergleichsweise gering ist. Die Auflistung unterstreicht allerdings auch die Notwendigkeit zur Klärung weiterer, offen gebliebener Charakteristika, bevor der klinische Einsatz in Erwägung gezogen werden kann. Allen voran sind hier die Differenzierung der HPCs sowie die Risiken, die Art und das Ausmaß der Leberrepopulation *in vivo* zu nennen. Letzteres kann im ersten Schritt nur durch tierexperimentelle Studien verifiziert werden.

Um einen therapeutischen Effekt zu erzielen, sind für die Hepatozytentransplantation bei akuter Leberinsuffizienz oder metabolischen Lebererkrankungen derzeit erhebliche Zellmengen erforderlich. So lag die minimal eingesetzte Zellzahl unter den bisher publizierten klinischen Transplantationen mit therapeutischer Wirkung bei  $3 \times 10^8$  Zellen<sup>35</sup>. Der Bedarf bei der BAL überschreitet dies sogar. Will man die isolierten HPCs zur Generierung einer adäquaten Zahl funktioneller Hepatozyten heranziehen, so muss festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit erhobenen Zellmengen dafür nicht ausreichen. Ausgehend von einer medianen Koloniausbeute von etwa 66 Kolonien pro Gramm Gewebe (Koloniegröße maximal 20 Zellen) kann aus theoretisch 1,5 kg zirrhotischer Leber lediglich mit dem Gewinn von etwa  $2 \times 10^6$  Zellen gerechnet werden. Damit sind die hier eingeführte Fraktionierung mit dem K-Gradienten und die serumfreie Kultivierung zwar für die vorliegenden Analysen ausreichend, für eine industrielle Nutzung stellen sie aber keine Option dar. Sollte in absehbarer Zeit eine relevante Expansion der HPCs mit längerer Überlebensdauer in Kultur gelingen, wären eine präzisere Charakterisierung mit der Identifizierung spezifischer Zellparameter und folglich die Entwicklung einer effizienteren Isolierungsmethode in greifbarer Nähe.

Der unmittelbare Einsatz intrahepatischer Vorläuferzellen für die Transplantation im terminalen Stadium chronischer Lebererkrankungen (*end-stage liver disease*) ist weitestgehend unerforscht. Erfahrungen, die aus Hepatozytentransplantationen hervorgehen, zeigen, dass die zerstörte Histoarchitektur zirrhotischer Lebern ein *Homing* der Spenderzellen in der Leber verhindert. Stattdessen bietet sich eine Injektion in die Milz an, die allerdings eine geringe Aufnahmekapazität und eine niedrige Immuntoleranz aufweist<sup>15</sup>. Die isolierten HPCs könnten insofern eine attraktive Alternative zu adulten Hepatozyten bilden, da sie einerseits aufgrund ihrer geringeren Größe leichter implantieren und andererseits bei autologer Gewinnung immunologisch inert wären.

## 5.6 Schlussfolgerungen

Mit der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung hepatischer Progenitorzellen aus humanem Lebergewebe erfolgreich demonstriert. Damit reiht sie sich in eine überschaubare Anzahl von Studien ein, die mit einem soliden Stichprobenumfang die Existenz von Stammzellen in menschlichen Lebern nachweisen konnten. Darüber hinaus wurde erstmals die Möglichkeit der Extraktion von HPCs aus ethyltoxisch bedingten zirrhotischen Leberresektaten aufgezeigt.

HPCs sind über einen kurzen Zeitraum von maximal zwei Monaten serumfrei kultivierbar. Sie weisen dabei eine mäßige Proliferationsrate in einem engen Zeitfenster auf, bevor ihr Wachstum spontan sistiert. Durch die Kokultur mit humanen Vorhautfibroblasten lassen sie sich allerdings weiter expandieren. Die Perspektive auf eine Anzucht ohne Verwendung tierischer Zusätze und eine Propagation der Zellen *in vitro* bildet die Grundlage für eine eventuelle therapeutische Anwendung der HPCs. Die morphologische und expressionsanalytische Phänotypisierung der HPCs unterstreicht den intermediären Charakter zwischen Stammzellen und reifen Leberzelltypen. Aufgrund des limitierten Zellmaterials konnte kein zellspezifischer Antigenmarker identifiziert werden, jedoch legten Expressionsprofil und Aussehen der HPCs eine verwandtschaftliche Nähe zu den von Schmelzer et al. beschriebenen Hepatoblasten und humanen Hepatischen Stammzellen nahe. Eine neoplastische Identität der HPCs mutet eher unwahrscheinlich an, kann aber nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Frage nach einer möglichen Lokalisation der HPCs *in vivo* ließ sich mit diesem Projekt nicht beantworten; allerdings können die histologischen Färbungen als Hinweis auf den Ursprung einer Stammzellentität in den periportalen Feldern und Interlobärsepten gewertet werden. Die Tatsache, dass mit den verwendeten Anreicherungsverfahren bei zirrhotischen Lebern eine 60-fach höhere Ausbeute an HPC-Kolonien als bei gesunden Lebern erzielt werden konnte, deutet auf einen außerordentlichen Gehalt an HPCs in nutritiv-toxischen Leberzirrhosen hin. Damit wird die Hypothese dieser Arbeit als bewiesen angesehen.

Die geglückte Isolierung und Kultivierung hepatischer Progenitorzellen aus zirrhotischen Leberresektaten stellt die Nutzung des chronisch geschädigten Gewebes für regenerative Verfahren in Aussicht. Die extrahierte Zellentität erfüllt wesentliche Kriterien, die für einen therapeutischen Einsatz als notwendig erachtet werden. Damit kann ihr ein erhebliches Potential für Klinik und Forschung attestiert werden. Bis zur tatsächlichen Anwendung der HPCs in Zelltherapie oder BAL müssen allerdings noch einige Hindernisse überwunden werden. Das dargestellte Isolierungsverfahren und die Kulturbedingungen sind für die Industrie in dieser



Form nur bedingt interessant, da sie Mischkulturen hervorbringen, durch eine geringe Überlebensdauer gekennzeichnet sind und Zellmengen liefern, die derzeit noch keine therapeutische Relevanz besitzen. Zur Steigerung der Gesamtzellmasse sollte zunächst die Optimierung der Kultivierung und Expansion der HPCs höchste Priorität haben, damit einer umfassenderen Charakterisierung mit der Identifizierung spezifischer Marker der Weg geebnet wird. Diese könnten im nächsten Schritt zur Anwendung immunselektiver Verfahren und damit zu einer gezielteren und effizienteren Isolierung der HPCs verhelfen. Daneben müssen Kernfragen zur Differenzierung, Funktion, Repopulationsfähigkeit *in vivo* und zum Entartungsrisiko beantwortet werden. Dafür sind tierexperimentelle Studien in naher Zukunft unumgänglich. Es bleibt abzuwarten, ob die HPCs auf dem Gebiet der Regenerativen Medizin anderen vielversprechenden Vorläuferzellkandidaten wie mesenchymalen Stammzellen oder induzierten pluripotenten Stammzellen künftig den Rang ablaufen können.

## 6. Zusammenfassung

Trotz des immensen Regenerationspotentials der Säugetierleber galt die Existenz adulter intrahepatischer Stammzellen lange Zeit als umstritten. Erst im Laufe der letzten 20 Jahre konnte die herausragende Rolle hepatischer Stamm- und Progenitorzellen bei der Leberregeneration nach chronischer Gewebeschädigung herausgearbeitet werden. Da dieses Wissen nahezu ausnahmslos im Tiermodell erworben wurde, bedurfte es einer Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen. Bisherigen Versuchen eines Nachweises von humanen Leberzellvorläufern waren primär aufgrund der Knappheit an Gewebe, des mangelhaft definierten Immunphänotyps und des vermutlich geringen Stammzellgehalts gesunder Lebern Grenzen gesetzt. Da die Untersuchung einiger chronischer Erkrankungen der Leber nahelegte, dass die Menge an Vorläuferzellen im Gewebe mit dem Grad der Schädigung korrelierte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass zirrhotische Lebern ethyltoxischer Genese ein Reservoir für hepatische Stamm- und Progenitorzellen darstellten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Möglichkeit zur Isolierung und Kultivierung hepatischer Progenitorzellen aus humanen gesunden und zirrhotischen Leberresektaten aufgezeigt.

Mittels einer Kombination aus Kollagenase-Perfusion und Dichtegradientenzentrifugation ist es gelungen, aus 13 gesunden und 10 ethyltoxisch bedingten zirrhotischen Leberproben eine koloniebildende Zellpopulation anzureichern. Dabei fiel die Kolonieausbeute bei zirrhotischem Gewebe etwa 60-fach höher aus als bei gesunder Leber. Die Anzucht des gewonnenen Zelltyps erfolgte *in vitro* unter weitestgehend serumfreien Bedingungen. Während Kolonien aus gesunden Lebern bis zu zwei Monate lang kultiviert werden konnten, überlebten solche aus zirrhotischen Lebern maximal zwei Wochen. Anhand von Zeitrafferaufnahmen und Bildersequenzen wurde proliferatives Wachstum der Zellen nachgewiesen und quantifiziert. Darüber hinaus konnte die Propagation durch Kokultur mit mesenchymalen Feederzellen erfolgreich demonstriert werden. Zur Bestimmung der Identität erfolgte die Phänotypisierung der Zellpopulation auf morphologischer, RNA- und Proteinebene. Hierfür wurde die Morphologie lichtmikroskopisch untersucht und die Gen- und Antigenexpression mit Hilfe von qualitativen RT-PCRs und Immunfluoreszenzfärbungen analysiert. Es ließen sich mit der Zellgröße von 6-12  $\mu\text{m}$ , der hohen Kern-Plasma-Relation, dem ovalen Zellkern und den Kolonieformationen deutliche Analogien zu anderen in der Literatur beschriebenen Vorläuferzellen der Leber feststellen. Ferner wies die simultane Expression von Markern für Stammzellen (EpCAM, NCAM), Hepatozyten (Albumin, Transferrin, HNF-4 $\alpha$ , CYP3A4, Connexin 32) und Cholangiozyten (CK19) auf eine Mittelstellung des Zelltyps zwischen diesen Differenzierungsgraden hin. Ein solcher intermediärer

Phänotyp wird in einschlägigen Publikationen oftmals Vorläuferzellen der Leber zugeordnet. Es wurde schließlich gefolgert, dass es sich bei der isolierten Zellpopulation um hepatische Progenitorzellen handeln musste.

Die beträchtliche Koloniausbeute aus zirrhotischen Leberteilektaten spiegelt einen außerordentlichen Gehalt an hepatischen Progenitorzellen im Gewebe wider. Damit würde sich eine Nutzung des chronisch geschädigten Gewebes zur Gewinnung dieser Zellen für klinische oder wissenschaftliche Zwecke anbieten. Mit der serumfreien Kultivierbarkeit, der Klonalität und der Propagierbarkeit erfüllen hepatische Progenitorzellen entscheidende Voraussetzungen für den potentiellen Einsatz in regenerativen Verfahren wie autologer Zelltherapie und bio-artifiziellen Leberunterstützungssystemen. Auf diese Weise könnten sie in absehbarer Zeit zur Entwicklung alternativer Behandlungsstrategien bei akuter und chronischer Leberinsuffizienz beitragen, deren einzige kurative Therapieoption derzeit die orthotope Lebertransplantation darstellt. Darüber hinaus wären Progenitorzellen für Gentherapie, Grundlagenforschung und bei gezielter Differenzierung auch für Toxizitätsmodelle von Pharmaka eine attraktive Ressource. Bevor jedoch eine klinische Anwendung in Erwägung gezogen werden kann, bedarf es weiterer Untersuchungen, deren Fokus auf die Optimierung von Expansion und Kultivierung gerichtet sein sollte; nur so können adäquate Zellmengen für eine umfassende funktionelle Charakterisierung sowie für *in vivo* Studien zur Abschätzung der Risiken und der Repopulationsfähigkeit hepatischer Progenitorzellen sichergestellt werden.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Andreoli,T.E., Carpenter,C.C.J., Griggs,R.C.G., & Benjamin,I.J. *Andreoli and Carpenter´s Cecil essentials of medicine* (Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA, 2007).
2. Taub,R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 836-847 (2004).
3. Michalopoulos,G.K. & DeFrances,M.C. Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66 (1997).
4. Higgins,G.M. & Anderson,R.M. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol Lab Med* **12**, 186-202 (1931).
5. Stocker,E. & Pfeifer,U. [On the manner of proliferation of the liver parenchyma after partial hepatectomy. Autoradiography studies using 3H-thymidine]. *Naturwissenschaften* **52**, 663 (1965).
6. Pascher,A. *et al.* Donor evaluation, donor risks, donor outcome, and donor quality of life in adult-to-adult living donor liver transplantation. *Liver Transpl.* **8**, 829-837 (2002).
7. Duncan,A.W., Dorrell,C., & Grompe,M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology* **137**, 466-481 (2009).
8. Renz-Polster,H., Krautzig,S., & Braun,J. *Basislehrbuch Innere Medizin* (Urban & Fischer Verlag, München, 2004).
9. Kisseleva,T., Gigante,E., & Brenner,D.A. Recent advances in liver stem cell therapy. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **26**, 395-402 (2010).
10. Fausto,N., Campbell,J.S., & Riehle,K.J. Liver regeneration. *Hepatology* **43**, S45-S53 (2006).
11. Mukherjee,S., Botha,J.F., & Mukherjee,U. Immunosuppression in liver transplantation. *Curr. Drug Targets.* **10**, 557-574 (2009).
12. Oosterlee,A. & Rahmel,A. Jahresbericht 2009 der Eurotransplant International Foundation. [http://www.eurotransplant.org/files/annual\\_report/ar\\_2009.pdf](http://www.eurotransplant.org/files/annual_report/ar_2009.pdf) (2010).
13. Sancho-Bru,P. *et al.* Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? *Gut* **58**, 594-603 (2009).
14. Dolle,L. *et al.* The quest for liver progenitor cells: a practical point of view. *J. Hepatol.* **52**, 117-129 (2010).
15. Ehnert,S. *et al.* The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch. Surg.* **394**, 985-997 (2009).
16. Fiegel,H.C. *et al.* Hepatic tissue engineering: from transplantation to customized cell-based liver directed therapies from the laboratory. *J. Cell Mol. Med* **12**, 56-66 (2008).

17. Gerlach,J.C., Zeilinger,K., & Patzer li,J.F. Bioartificial liver systems: why, what, whither? *Regen. Med* **3**, 575-595 (2008).
18. McKenzie,T.J., Lillegard,J.B., & Nyberg,S.L. Artificial and bioartificial liver support. *Semin. Liver Dis.* **28**, 210-217 (2008).
19. Sipe,J.D. Tissue engineering and reparative medicine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **961**, 1-9 (2002).
20. Tada,K. *et al.* Long-term reduction of serum bilirubin levels in Gunn rats by retroviral gene transfer in vivo. *Liver Transpl. Surg.* **4**, 78-88 (1998).
21. Guha,C. *et al.* Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology* **36**, 354-362 (2002).
22. Attaran,M. *et al.* Regional and transient ischemia/reperfusion injury in the liver improves therapeutic efficacy of allogeneic intraportal hepatocyte transplantation in low-density lipoprotein receptor deficient Watanabe rabbits. *J. Hepatol.* **41**, 837-844 (2004).
23. Laconi,S. *et al.* Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am. J. Pathol.* **158**, 771-777 (2001).
24. Tateno,C. *et al.* Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am. J. Pathol.* **165**, 901-912 (2004).
25. Overturf,K., al-Dhalimy,M., Ou,C.N., Finegold,M., & Grompe,M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am. J. Pathol.* **151**, 1273-1280 (1997).
26. Fox,I.J. *et al.* Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* **338**, 1422-1426 (1998).
27. Muraca,M. *et al.* Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* **359**, 317-318 (2002).
28. Meyburg,J. *et al.* One liver for four children: first clinical series of liver cell transplantation for severe neonatal urea cycle defects. *Transplantation* **87**, 636-641 (2009).
29. Dhawan,A. *et al.* Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation* **78**, 1812-1814 (2004).
30. Stephenne,X. *et al.* Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology* **130**, 1317-1323 (2006).
31. Zhang,W. *et al.* Cell-delivery therapeutics for liver regeneration. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **62**, 814-826 (2010).

32. Alison,M.R., Choong,C., & Lim,S. Application of liver stem cells for cell therapy. *Semin. Cell Dev. Biol.* **18**, 819-826 (2007).
33. Alison,M.R., Islam,S., & Lim,S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J. Pathol.* **217**, 282-298 (2009).
34. Gaudio,E. *et al.* New insights into liver stem cells. *Dig. Liver Dis.* **41**, 455-462 (2009).
35. Khan,A.A. *et al.* Peritoneal transplantation of human fetal hepatocytes for the treatment of acute fatty liver of pregnancy: a case report. *Trop. Gastroenterol.* **25**, 141-143 (2004).
36. Dan,Y.Y. & Yeoh,G.C. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **23**, 687-698 (2008).
37. Horslen,S.P. *et al.* Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* **111**, 1262-1267 (2003).
38. Potten,C.S. & Loeffler,M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020 (1990).
39. Thomson,J.A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).
40. Turksen,K. *Adult stem cells*(Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004).
41. Cantz,T., Manns,M.P., & Ott,M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell Tissue Res.* **331**, 271-282 (2008).
42. Asahina,K., Teramoto,K., & Teraoka,H. Embryonic stem cells: hepatic differentiation and regenerative medicine for the treatment of liver disease. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **1**, 139-156 (2006).
43. Sullivan,G.J. *et al.* Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells. *Hepatology* **51**, 329-335 (2010).
44. Dabeva,M.D. *et al.* Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am. J. Pathol.* **156**, 2017-2031 (2000).
45. Nierhoff,D., Ogawa,A., Oertel,M., Chen,Y.Q., & Shafritz,D.A. Purification and characterization of mouse fetal liver epithelial cells with high in vivo repopulation capacity. *Hepatology* **42**, 130-139 (2005).
46. Baxter,M.A. *et al.* Generating hepatic cell lineages from pluripotent stem cells for drug toxicity screening. *Stem Cell Res.* **5**, 4-22 (2010).
47. Gennero,L. *et al.* Pluripotent plasticity of stem cells and liver repopulation. *Cell Biochem. Funct.* **28**, 178-189 (2010).
48. Sell,S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res.* **50**, 3811-3815 (1990).

49. Riehle,K.J., Dan,Y.Y., Campbell,J.S., & Fausto,N. New concepts in liver regeneration. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **26 Suppl 1**, 203-212 (2011).
50. Roskams,T., Katoonizadeh,A., & Komuta,M. Hepatic progenitor cells: an update. *Clin. Liver Dis.* **14**, 705-718 (2010).
51. Erker,L. & Grompe,M. Signaling networks in hepatic oval cell activation. *Stem Cell Res.* **1**, 90-102 (2007).
52. Lindroos,P.M., Zarnegar,R., & Michalopoulos,G.K. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* **13**, 743-750 (1991).
53. Nguyen,L.N. *et al.* Transforming growth factor-beta differentially regulates oval cell and hepatocyte proliferation. *Hepatology* **45**, 31-41 (2007).
54. Roskams,T. *et al.* Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Pathol.* **163**, 1301-1311 (2003).
55. Lowes,K.N., Brennan,B.A., Yeoh,G.C., & Olynyk,J.K. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am. J. Pathol.* **154**, 537-541 (1999).
56. Alison,M.R., Golding,M., Sarraf,C.E., Edwards,R.J., & Lalani,E.N. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* **110**, 1182-1190 (1996).
57. Theise,N.D. *et al.* The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* **30**, 1425-1433 (1999).
58. Fougere-Deschatrette,C. *et al.* Plasticity of hepatic cell differentiation: bipotential adult mouse liver clonal cell lines competent to differentiate in vitro and in vivo. *Stem Cells* **24**, 2098-2109 (2006).
59. Fausto,N. & Campbell,J.S. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech. Dev.* **120**, 117-130 (2003).
60. Roskams,T.A. *et al.* Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology* **39**, 1739-1745 (2004).
61. Viebahn,C.S. & Yeoh,G.C. What fires prometheus? The link between inflammation and regeneration following chronic liver injury. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 855-873 (2008).
62. Strick-Marchand,H., Masse,G.X., Weiss,M.C., & Di Santo,J.P. Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J. Immunol.* **181**, 2764-2771 (2008).
63. Hay,D.C. *et al.* Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 12301-12306 (2008).

64. Farber,E. Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylamino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **16**, 142-148 (1956).
65. Fausto,N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* **39**, 1477-1487 (2004).
66. Yasui,O. *et al.* Isolation of oval cells from Long-Evans Cinnamon rats and their transformation into hepatocytes in vivo in the rat liver. *Hepatology* **25**, 329-334 (1997).
67. Wang,X. *et al.* The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100 Suppl 1**, 11881-11888 (2003).
68. Chen,Q., Kon,J., Ooe,H., Sasaki,K., & Mitaka,T. Selective proliferation of rat hepatocyte progenitor cells in serum-free culture. *Nat. Protoc.* **2**, 1197-1205 (2007).
69. Sasaki,K. *et al.* Proliferation of hepatocyte progenitor cells isolated from adult human livers in serum-free medium. *Cell Transplant.* **17**, 1221-1230 (2008).
70. Shibata,C. *et al.* Liver repopulation and long-term function of rat small hepatocyte transplantation as an alternative cell source for hepatocyte transplantation. *Liver Transpl.* **12**, 78-87 (2006).
71. Kon,J., Ooe,H., Oshima,H., Kikkawa,Y., & Mitaka,T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J. Hepatol.* **45**, 90-98 (2006).
72. Niimi,S. *et al.* Isolated small rat hepatocytes express both annexin III and terminal differentiated hepatocyte markers, tyrosine aminotransferase and tryptophan oxygenase, at the mRNA level. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, 1864-1866 (2004).
73. Schmelzer,E. *et al.* Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J. Exp. Med.* **204**, 1973-1987 (2007).
74. Schmelzer,E., Wauthier,E., & Reid,L.M. The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors. *Stem Cells* **24**, 1852-1858 (2006).
75. Najimi,M. *et al.* Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell Transplant.* **16**, 717-728 (2007).
76. Khuu,D.N. *et al.* In vitro differentiated adult human liver progenitor cells display mature hepatic metabolic functions: a potential tool for in vitro pharmacotoxicological testing. *Cell Transplant.* **20**, 287-302 (2011).
77. Herrera,M.B. *et al.* Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* **24**, 2840-2850 (2006).
78. Duret,C. *et al.* Isolation, characterization, and differentiation to hepatocyte-like cells of nonparenchymal epithelial cells from adult human liver. *Stem Cells* **25**, 1779-1790 (2007).



79. Khuu,D.N., Najimi,M., & Sokal,E.M. Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? *World J. Gastroenterol.* **13**, 1554-1560 (2007).
80. Dan,Y.Y. *et al.* Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 9912-9917 (2006).
81. Wang,X. *et al.* Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901 (2003).
82. Vassilopoulos,G., Wang,P.R., & Russell,D.W. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-904 (2003).
83. Thorgeirsson,S.S. & Grisham,J.W. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology* **43**, 2-8 (2006).
84. Kuo,T.K. *et al.* Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. *Gastroenterology* **134**, 2111-21, 2121 (2008).
85. Sato,Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* **106**, 756-763 (2005).
86. am Esch,J.S. *et al.* Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells* **23**, 463-470 (2005).
87. Banas,A. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* **46**, 219-228 (2007).
88. Aurich,H. *et al.* Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* **58**, 570-581 (2009).
89. Russo,F.P. *et al.* The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* **130**, 1807-1821 (2006).
90. Takahashi,K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872 (2007).
91. Yu,J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920 (2007).
92. Huang,P. *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* **475**, 386-389 (2011).
93. Moore,K.A. & Lemischka,I.R. Stem cells and their niches. *Science* **311**, 1880-1885 (2006).
94. Wilson,A. & Trumpp,A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 93-106 (2006).
95. Parati,E.A. *et al.* Neural stem cells: an overview. *J. Endocrinol. Invest* **27**, 64-67 (2004).

96. Christiano,A.M. Epithelial stem cells: stepping out of their niche. *Cell* **118**, 530-532 (2004).
97. He,X.C. *et al.* BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat. Genet.* **36**, 1117-1121 (2004).
98. Roskams,T. Different types of liver progenitor cells and their niches. *J. Hepatol.* **45**, 1-4 (2006).
99. Zajicek,G., Oren,R., & Weinreb,M., Jr. The streaming liver. *Liver* **5**, 293-300 (1985).
100. Fellous,T.G. *et al.* Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver. *Hepatology* **49**, 1655-1663 (2009).
101. Bralet,M.P., Branchereau,S., Brechot,C., & Ferry,N. Cell lineage study in the liver using retroviral mediated gene transfer. Evidence against the streaming of hepatocytes in normal liver. *Am. J. Pathol.* **144**, 896-905 (1994).
102. Kuwahara,R. *et al.* The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay. *Hepatology* **47**, 1994-2002 (2008).
103. Wright,N., Samuelson,L., Walkup,M.H., Chandrasekaran,P., & Gerber,D.A. Enrichment of a bipotent hepatic progenitor cell from naive adult liver tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **366**, 367-372 (2008).
104. Snykers,S., De,K.J., Rogiers,V., & Vanhaecke,T. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells* **27**, 577-605 (2009).
105. Sancho-Bru,P. *et al.* Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? *Gut* **58**, 594-603 (2009).
106. Shupe,T.D., Piscaglia,A.C., Oh,S.H., Gasbarrini,A., & Petersen,B.E. Isolation and characterization of hepatic stem cells, or "oval cells," from rat livers. *Methods Mol. Biol.* **482**, 387-405 (2009).
107. Rountree,C.B. *et al.* A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells* **25**, 2419-2429 (2007).
108. Yovchev,M.I., Grozdanov,P.N., Joseph,B., Gupta,S., & Dabeva,M.D. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology* **45**, 139-149 (2007).
109. Yovchev,M.I. *et al.* Identification of adult hepatic progenitor cells capable of repopulating injured rat liver. *Hepatology* **47**, 636-647 (2008).
110. Lemaigre,F.P. Mechanisms of liver development: concepts for understanding liver disorders and design of novel therapies. *Gastroenterology* **137**, 62-79 (2009).
111. Zhao,D. *et al.* Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS. One.* **4**, e6468 (2009).

112. Chiu,C.C. *et al.* Global gene expression profiling reveals a key role of CD44 in hepatic oval-cell reaction after 2-AAF/CC14 injury in rodents. *Histochem. Cell Biol.* **132**, 479-489 (2009).
113. Shafritz,D.A., Oertel,M., Menthen,A., Nierhoff,D., & Dabeva,M.D. Liver stem cells and prospects for liver reconstitution by transplanted cells. *Hepatology* **43**, S89-S98 (2006).
114. Viebahn,C.S. *et al.* Invading macrophages play a major role in the liver progenitor cell response to chronic liver injury. *J. Hepatol.* **53**, 500-507 (2010).
115. Roskams,T. Relationships among stellate cell activation, progenitor cells, and hepatic regeneration. *Clin. Liver Dis.* **12**, 853-60, ix (2008).
116. Libbrecht,L. & Roskams,T. Hepatic progenitor cells in human liver diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 389-396 (2002).
117. Bird,T.G., Lorenzini,S., & Forbes,S.J. Activation of stem cells in hepatic diseases. *Cell Tissue Res.* **331**, 283-300 (2008).
118. Roskams,T. Progenitor cell involvement in cirrhotic human liver diseases: from controversy to consensus. *J. Hepatol.* **39**, 431-434 (2003).
119. Libbrecht,L., Desmet,V., Van,D.B., & Roskams,T. Deep intralobular extension of human hepatic 'progenitor cells' correlates with parenchymal inflammation in chronic viral hepatitis: can 'progenitor cells' migrate? *J. Pathol* **192**, 373-378 (2000).
120. Dorko,K. *et al.* A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. *Cell Transplant.* **3**, 387-395 (1994).
121. Chomczynski,P. & Sacchi,N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* **1**, 581-585 (2006).
122. Nagai,H. *et al.* Differentiation of liver epithelial (stem-like) cells into hepatocytes induced by coculture with hepatic stellate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1420-1425 (2002).
123. Jiang,D., Liang,J., & Noble,P.W. Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiol Rev.* **91**, 221-264 (2011).
124. Spee,B. *et al.* Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut* **59**, 247-257 (2010).
125. Roskams,T.A., Libbrecht,L., & Desmet,V.J. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin. Liver Dis.* **23**, 385-396 (2003).
126. Pinzani,M., Rosselli,M., & Zuckermann,M. Liver cirrhosis. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **25**, 281-290 (2011).
127. Sharpless,N.E. & DePinho,R.A. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 703-713 (2007).

128. Timchenko,N.A. Aging and liver regeneration. *Trends Endocrinol. Metab* **20**, 171-176 (2009).
129. Schmelzer,E. *et al.* Hepatic stem cells and the liver's maturational lineages: implications for liver biology, gene expression, and cell therapies in *Tissue stem cells* (eds. Potten,C.S., Clarke,R.B., Wilson,J. & Renehan,A.G.) 161-214 (Informa Healthcare, London, UK, 2006).
130. Cooke,J.A. & Minger,S.L. Human embryonal stem cell lines: derivation and culture in *Culture of Human Stem Cells* (ed. Freshney,R.I.) 23-60 (John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2007).
131. del,C.G. *et al.* Deletion of the Met tyrosine kinase in liver progenitor oval cells increases sensitivity to apoptosis in vitro. *Am. J. Pathol* **172**, 1238-1247 (2008).
132. Ehnert,S. *et al.* Autologous Serum improves Yield and Metabolic Capacity of Monocyte-derived Hepatocyte-like Cells : Possible Implication for Cell Transplantation. *Cell Transplant.* (2011).
133. Jung,Y. *et al.* Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut* **59**, 655-665 (2010).
134. Wang,Y. *et al.* Paracrine signals from mesenchymal cell populations govern the expansion and differentiation of human hepatic stem cells to adult liver fates. *Hepatology* **52**, 1443-1454 (2010).
135. Oertel,M., Menthen,A., Chen,Y.Q., & Shafritz,D.A. Properties of cryopreserved fetal liver stem/progenitor cells that exhibit long-term repopulation of the normal rat liver. *Stem Cells* **24**, 2244-2251 (2006).
136. Kon,J., Ooe,H., Oshima,H., Kikkawa,Y., & Mitaka,T. Expression of CD44 in rat hepatic progenitor cells. *J. Hepatol.* **45**, 90-98 (2006).
137. Strick-Marchand,H. & Weiss,M.C. Permanent lines of stem cells from the liver in *Stem Cells Handbook* (ed. Sell,S.) 385-395 (Humana Press, Totowa, NJ, 2004).
138. Dumble,M.L., Croager,E.J., Yeoh,G.C., & Quail,E.A. Generation and characterization of p53 null transformed hepatic progenitor cells: oval cells give rise to hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **23**, 435-445 (2002).
139. Paku,S., Nagy,P., Kopper,L., & Thorgeirsson,S.S. 2-acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* **39**, 1353-1361 (2004).
140. Ooe,H. *et al.* Cytochrome p450 expression of cultured rat small hepatocytes after long-term cryopreservation. *Drug Metab Dispos.* **34**, 1667-1671 (2006).
141. Kon,J. *et al.* Thyl-positive cells have bipotential ability to differentiate into hepatocytes and biliary epithelial cells in galactosamine-induced rat liver regeneration. *Am. J. Pathol.* **175**, 2362-2371 (2009).

142. Kuver,R., Savard,C.E., Lee,S.K., Haigh,W.G., & Lee,S.P. Murine gallbladder epithelial cells can differentiate into hepatocyte-like cells in vitro. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **293**, G944-G955 (2007).
143. Ward,S.C. *et al.* Fibrolamellar carcinoma of the liver exhibits immunohistochemical evidence of both hepatocyte and bile duct differentiation. *Mod. Pathol* **23**, 1180-1190 (2010).
144. He,Y. *et al.* Interaction of CD44 and hyaluronic acid enhances biliary epithelial proliferation in cholestatic livers. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* **295**, G305-G312 (2008).
145. Deng,H., Wang,H.F., Gao,Y.B., Jin,X.L., & Xiao,J.C. Hepatic progenitor cell represents a transitioning cell population between liver epithelium and stroma. *Med Hypotheses*(2011).
146. Kimura,O. *et al.* Characterization of the epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)+ cell population in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Sci.* **101**, 2145-2155 (2010).
147. Kozaka,K. *et al.* A subgroup of intrahepatic cholangiocarcinoma with an infiltrating replacement growth pattern and a resemblance to reactive proliferating bile ductules: 'bile ductular carcinoma'. *Histopathology* **51**, 390-400 (2007).
148. Gupta,P.B., Chaffer,C.L., & Weinberg,R.A. Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat. Med.* **15**, 1010-1012 (2009).
149. Rangwala,F., Omenetti,A., & Diehl,A.M. Cancer stem cells: repair gone awry? *J. Oncol.* **2011**, 465343 (2011).
150. Panchision,D.M. *et al.* Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem Cells* **25**, 1560-1570 (2007).

## 8. Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Patrick Kupczyk, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema ‚Isolierung, serumfreie Kultivierung und Phänotypisierung hepatischer Progenitorzellen aus humanen gesunden und zirrhotischen Resektaten‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## 9. Danksagungen

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Matthias Glanemann für die Überlassung des Themas und seine uneingeschränkte Unterstützung des Projektes. Er hat mir damit die Zusammenarbeit mit Menschen ermöglicht, die mich nicht nur fachlich, sondern vor allem persönlich bereichert haben.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. rer. medic. Daniel Knobloch, der mich unter unermüdlichem, zeitweise auch nächtlichem Einsatz über mein gesamtes Projekt hinweg begleitet und angeleitet hat. Mit unzähligen Denkanstößen hat er maßgeblich zum Abschluss der Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Antje Blankenstein, Frau Anja Schirmeier und Frau Jennifer Golembus bedanken, die mir insbesondere beim praktischen Teil beratend zur Seite gestanden haben und stets ein offenes Ohr für meine Anliegen sowie eine helfende Hand übrig hatten.

Ich danke auch meinen Eltern, die mir unter Zurückstellung eigener Bedürfnisse meine Ausbildung ermöglicht und damit die Voraussetzungen für diese Arbeit geschaffen haben. Das ist für mich alles andere als selbstverständlich.

Schließlich möchte ich Dir aus tiefstem Herzen danken, liebe Zeinab. Dein liebevoller Rückhalt hat mir die Kraft und den Mut geschenkt, diesen Weg bis zum Ende zu gehen. Dass ich zu diesen Zeilen durchgedrungen bin, ist zum größten Teil Dein Verdienst. Danke dafür.

**Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.**