

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS J. SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*EXPERIMENTELLE STUDIE ZUR UNTERSUCHUNG DES REGENERATIVEN
POTENTIALS MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN EINEM CHRONISCHEN
LEBERSCHÄDIGUNGSMODELL*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Przemyslaw K. Slowik

2011

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS J. SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*EXPERIMENTELLE STUDIE ZUR UNTERSUCHUNG DES REGENERATIVEN
POTENTIALS MESENCHYMALER STAMMZELLEN IN EINEM CHRONISCHEN
LEBERSCHÄDIGUNGSMODELL*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Przemyslaw K. Slowik

2011

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

PD Dr. med. PhD Marc H. Dahlke

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Reiner Wiest

Tag der mündlichen Prüfung:

12. September 2011

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|--------|
| Inhaltsverzeichnis..... | - 4 - |
| 1 Einleitung..... | - 7 - |
| 1.1 Stammzellapplikation als Alternativtherapie bei terminalen Lebererkrankungen | - 7 - |
| 1.2 Begriffsklärung „Stammzelle“ | - 9 - |
| 1.3 Leberregeneration durch embryonale Stammzellen..... | - 9 - |
| 1.4 Leberregeneration durch adulte Stammzellen..... | - 10 - |
| 1.5 Mesenchymale Stammzellen..... | - 13 - |
| 1.6 Stufenmodell der Leberregeneration | - 15 - |
| 1.7 Etablierung eines Leberschädigungsmodells in der Ratte..... | - 17 - |
| 1.8 Fragestellung | - 19 - |
| 2 Material und Methoden..... | - 20 - |
| 2.1 Material | - 20 - |
| 2.1.1 Verbrauchsmaterial, Eindeck- und Zellkulturmedien..... | - 20 - |
| 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien | - 21 - |
| 2.1.3 Antikörper und Standardkonzentrationen..... | - 22 - |
| 2.1.4 Geräte..... | - 23 - |
| 2.1.5 Instrumente und sonstige Materialien..... | - 24 - |
| 2.1.6 PC-Programme | - 24 - |
| 2.2 Methoden..... | - 25 - |
| 2.2.1 Gewinnung und Kultur von mesenchymalen Stammzellen | - 25 - |
| 2.2.2 Klassische Differenzierung von MSC | - 25 - |
| 2.2.3 <i>in vitro</i> -Stimulation von MSC in Kultur..... | - 27 - |
| 2.2.4 Gewinnung und Aufbereitung von Hepatozyten | - 27 - |
| 2.2.5 Immunophänotypisierung von MSC und Hepatozyten | - 28 - |
| 2.2.6 Versuchstiere | - 30 - |
| 2.2.7 Anästhesie und Narkotika..... | - 30 - |
| 2.2.8 Schädigung der Leber | - 30 - |
| 2.2.9 Zelltransplantation | - 33 - |
| 2.2.10 Tiermodelle..... | - 34 - |
| 2.2.11 Zelldistribution | - 38 - |
| 2.2.12 Histologische Färbungen | - 41 - |

| | | |
|--------|---|--------|
| 2.2.13 | Immunhistologische Färbungen..... | - 42 - |
| 2.2.14 | Lichtmikroskopische Auswertung | - 43 - |
| 3 | Ergebnisse | - 45 - |
| 3.1 | Langzeitkultur von MSC | - 45 - |
| 3.2 | Klassische Differenzierung von MSC | - 46 - |
| 3.2.1 | Differenzierung in Adipozyten | - 46 - |
| 3.2.2 | Differenzierung in Osteoblasten | - 46 - |
| 3.2.3 | Differenzierung in Chondrozyten | - 47 - |
| 3.2.4 | Zusammenfassung | - 47 - |
| 3.3 | Immunophänotypisierung von MSC und Hepatozyten | - 48 - |
| 3.4 | Zelldistribution | - 48 - |
| 3.4.1 | Distribution BrdU-markierter MSC..... | - 49 - |
| 3.4.2 | Distribution GFP-transfizierter MSC | - 50 - |
| 3.4.3 | Zusammenfassung | - 51 - |
| 3.5 | Applikation von Hepatozyten bei subakutem Leberversagen..... | - 52 - |
| 3.5.1 | Behandlung mit Retrorsine ohne zusätzliche Leberschädigung..... | - 52 - |
| 3.5.2 | Leberschädigung mit CCl ₄ | - 53 - |
| 3.5.3 | Leberschädigung mit AA..... | - 53 - |
| 3.5.4 | Leberschädigung mit CCl ₄ oder AA in Verbindung mit Retrorsine..... | - 54 - |
| 3.5.5 | Zusammenfassung | - 55 - |
| 3.6 | Applikation von MSC bei subakutem Leberversagen..... | - 56 - |
| 3.6.1 | Behandlung mit Retrorsine ohne zusätzliche Leberschädigung..... | - 56 - |
| 3.6.2 | Leberschädigung mit CCl ₄ in Verbindung mit Retrorsine | - 56 - |
| 3.6.3 | Leberschädigung mit AA in Verbindung mit Retrorsine | - 57 - |
| 3.6.4 | Leberschädigung mit AA ohne Retrorsine | - 57 - |
| 3.6.5 | <i>in vitro</i> -Stimulation von MSC und Leberschädigung durch AA mit/ohne Retrorsine | - 58 - |
| 3.6.6 | Zusammenfassung | - 58 - |
| 4 | Diskussion..... | - 60 - |
| 4.1 | <i>In vitro</i> -Eigenschaften von MSC und Hepatozyten | - 60 - |
| 4.2 | Distribution und Verbleib von MSC in der Leber..... | - 61 - |
| 4.3 | Beitrag von Hepatozyten und MSC an der Leberregeneration | - 64 - |
| 4.4 | Keine hepatische Differenzierung von MSC <i>in vivo</i> bei Leberschädigung | - 66 - |
| 5 | Ausblick | - 74 - |

| | | |
|-----|---------------------------------|---------|
| 6 | Zusammenfassung | - 78 - |
| 7 | Abstract | - 80 - |
| 8 | Anhänge | - 81 - |
| 8.1 | Adipozyten-Nachweis | - 81 - |
| 8.2 | Osteoblasten-Nachweis | - 82 - |
| 8.3 | Chondrozyten-Nachweis | - 83 - |
| 8.4 | FACS-Messungen | - 84 - |
| 8.5 | Immunhistochemie | - 85 - |
| 8.6 | Feinbau der Leber..... | - 87 - |
| 8.7 | Abkürzungen | - 88 - |
| 9 | Literatur | - 92 - |
| 10 | Lebenslauf..... | - 98 - |
| 11 | Eidesstattliche Erklärung | - 99 - |
| 12 | Danksagung | - 100 - |

1 Einleitung

1.1 Stammzellapplikation als Alternativtherapie bei terminalen Lebererkrankungen

Die Leber ist ein Organ mit einer zentralen Rolle im Stoffwechsel des Menschen. Zu ihren wichtigsten Aufgaben gehört die Verwertung und Speicherung von Nahrungsbestandteilen, die Produktion der Galle, die Synthese lebenswichtiger Proteine, sowie der Abbau, die Entgiftung und die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, Giften und Medikamenten. Der Ausfall dieser Funktionen im Rahmen einer akuten oder chronischen Lebererkrankung, wie zum Beispiel Intoxikation oder Leberzirrhose, bedeutet für den Patienten einen lebensgefährlichen Zustand und kann ohne adäquate Therapie zum Tod des Erkrankten führen. Bei terminalem Leberversagen bietet die Lebertransplantation eine definitive Chance auf Heilung und ist somit die Methode der Wahl. Es handelt sich jedoch dabei um einen risikoreichen operativen Eingriff, der eine Reihe schwerer Komplikationen mit sich bringen kann. Zudem erfordert eine allogene Organtransplantation in den meisten Fällen eine lebenslange Therapie mit immunsuppressiven Medikamenten, die eine nicht unerhebliche Anzahl an Nebenwirkungen besitzen und somit die Lebensqualität der Patienten deutlich einschränken. Durch stetige Verbesserung der Operationstechnik und der Forschung auf dem Gebiet der Immunsuppression können zwar 10-Jahres-Überlebensraten von über 70% erreicht werden¹, doch veranlassen die Nachteile dieser Therapie viele Wissenschaftler und Ärzte dazu, nach neuen Methoden in der Behandlung schwerer Lebererkrankungen zu suchen.

Darüber hinaus kommt der Mangel an Spenderorganen als eines der Hauptprobleme in der Transplantationsmedizin hinzu. Im Jahr 2007 befanden sich in der Bundesrepublik Deutschland 1881 Patienten mit einer terminalen Lebererkrankung auf der Warteliste für eine Lebertransplantation. Im selben Jahr konnten aber nur 1041 Organe transplantiert werden². Trotz der Entwicklung neuer Operationstechniken, wie Split-Lebertransplantation³ oder Leber-Lebendspende⁴, verdeutlichen diese Zahlen, dass der Organmangel nach wie vor eine erhebliche Schwierigkeit bei der erfolgreichen Behandlung von Patienten mit Leberversagen darstellt. Aus den oben genannten Gründen wird folglich derzeit mit Nachdruck nach alternativen, beziehungsweise supportiven Therapieoptionen zur Lebertransplantation gesucht.

Es gibt unterschiedliche Ansätze in dieser Richtung. Zum einen wird unter sehr hohem finanziellen und technischen Aufwand versucht am Beispiel anderer Organe, wie Niere, Herz oder Lunge, artifizielle Ersatztherapien für die Leber zu entwickeln. Die Effektivität der im Moment zur Verfügung stehenden biologischen oder nicht biologischen Systeme scheint nach Auswertung der vorläufigen Ergebnisse nicht gesichert zu sein und eine Erhebung verlässlicher Daten durch qualitativ hochwertige Studien gestaltet sich schwierig⁵. Eine weitere Möglichkeit der Therapie bei Leberversagen ist die Transplantation von Hepatozyten. Die Überlegung bei diesem Ansatz entspricht vom Grundprinzip dem, was auch bei biologischen Ersatztherapieverfahren zum Einsatz kommt, die mit Leberzellen aus nicht transplantierbaren Spenderorganen, Tumorzelllinien oder Schweinehepatozyten arbeiten⁶. In klinischen Studien wurden bereits Hepatozyten bei metabolischen Lebererkrankungen erfolgreich transplantiert. Die meisten Patienten zeigten sowohl eine Verbesserung der Symptome, als auch der Organfunktion⁷. Allerdings hat dieses Verfahren dieselben Nachteile, die eine Transplantation eines vollständigen Organs mit sich bringt. Die Gewinnung von Hepatozyten ist von dem Angebot an Spenderorganen abhängig, da Leberzellen sich sehr schlecht *in vitro* kultivieren und expandieren lassen⁸. Hinzu kommt, dass die Zelltransplantation in fast allen Fällen allogenen durchgeführt werden müsste, was ebenfalls eine lebenslange Immunsuppression zur Folge hätte.

Auf der Suche nach weiteren Alternativen scheint sich mit dem wachsenden Fortschritt in der Stammzellforschung ein sehr vielversprechender Ansatz zur Therapie terminaler Lebererkrankungen zu ergeben. Stammzellen unterschiedlichen ontogenetischen Alters können sich entsprechend ihrem Potential in verschiedene Zelltypen und Gewebearten differenzieren und somit zur Regeneration von geschädigtem oder funktionslosem Gewebe führen. Je nach biologischer Herkunft lassen sich manche dieser Zellen schnell und vergleichsweise einfach gewinnen und kultivieren. Zu therapeutischen Zwecken kann man Stammzellen intravenös oder durch direkte Injektion in das krankhafte Organ applizieren, wodurch sich die Risiken und die Belastung einer aufwändigen Operation erübrigen. Für Patienten mit schweren Lebererkrankungen sind sowohl kurative als auch unterstützende Verfahren unter Einsatz von Stammzellen vorstellbar. In letzterem Fall käme das „*bridge to transplantation*“-Prinzip zur Anwendung, das bereits chirurgisch bei unterstützender Organtransplantation im akuten Leberversagen genutzt wird⁹. Anstatt ein ganzes Organ operativ zur Aufrechterhaltung der Leberfunktion zu transplantieren, könnte eine

Stammzelltherapie diese Aufgabe bis zu dem Zeitpunkt übernehmen, an dem eine geeignete Spenderleber zur Verfügung stehen würde. Denkbar ist in diesem Zusammenhang auch eine Kombination aus den oben erwähnten biologischen Ersatztherapien und Stammzelltechnologie. Doch bevor die Stammzelltherapie im klinischen Alltag Anwendung finden kann, muss das Potential der verschiedenen Stammzellarten eingehend untersucht werden, um ein besseres Verständnis ihres biologischen Verhaltens und ihrer Wirkungsmechanismen für mögliche therapeutische Zwecke zu erlangen.

1.2 Begriffsklärung „Stammzelle“

Unter dem Begriff Stammzelle versteht man einen undifferenzierten Zelltypus, der definitionsgemäß zwei Funktionen erfüllen muss. Zum einen besitzt er die Fähigkeit der unbegrenzten Selbsterneuerung durch „symmetrische“ Zellteilung, bei der mindestens eine identische Tochterzelle entsteht. Zum anderen werden Tochterzellen generiert, die in bestimmte Zell- oder Gewebearten differenzieren können. Diesen Vorgang nennt man „asymmetrische“ Zellteilung¹⁰. Ferner können aus Stammzellen Vorläufer, sogenannte Progenitorzellen, hervorgehen, die ebenfalls eine hohe Zahl festgelegter spezialisierter Zellen generieren, sich jedoch nicht selbst erneuern können. Grundsätzlich werden aufgrund ihrer Herkunft und ihres Differenzierungspotentials embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Embryonale Stammzellen lassen sich aus der inneren Zellmasse von Blastozysten isolieren und *in vitro* praktisch unbegrenzt kultivieren¹¹. Sie sind pluripotent, das heißt aus einer Zelle können Zellen aller drei Keimblätter (Endoderm, Ektoderm, Mesoderm) und Keimbahnzellen ausdifferenzieren¹². Im Gegensatz dazu ist das Differenzierungspotential adulter Stammzellen eingeschränkt und sie gelten als multipotent¹³. Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass sie nur Zellen innerhalb eines Keimblattes hervorbringen könnten. Neuen Erkenntnissen zufolge können jedoch einige adulte Stammzellen Gewebearten außerhalb ihres Keimblattes generieren. Dieses Phänomen wurde jüngst als „Stammzellplastizität“ beschrieben^{14, 15}. Die Fähigkeit von Stammzellen, sich in ein Gewebe eines unterschiedlichen Organsystems zu differenzieren, bezeichnet man auch als „Transdifferenzierung“¹⁶ (siehe Kapitel 1.4.).

1.3 Leberregeneration durch embryonale Stammzellen

Mit der Isolierung und Kultivierung humaner embryonaler Stammzellen in den 90er Jahren eröffneten sich auf dem Gebiet der medizinischen Forschung einzigartige neue Ansätze in der

Therapie einer Vielzahl von Krankheiten¹¹. Durch ihre unbegrenzte Kapazität zur Selbsterneuerung und die Fähigkeit, in alle wichtigen Zelllinien auszureifen, sind diese Zellen auch eine potentielle Quelle für die lebergerichtete Zelltherapie. Es wurde bereits in vielen Studien berichtet, dass sich embryonale Stammzellen sowohl von Mäusen als auch von Menschen in hepatozytenähnliche Zellen differenzieren lassen¹⁷⁻²⁴. Vielfach sind hierfür die Zellen *in vitro* mit hepatozytenspezifischen Zytokinen behandelt¹⁹ oder durch spezielle Kulturbedingungen^{17, 18, 20, 22} stimuliert worden. Darüber hinaus wurde in einem Mausmodell gezeigt, dass transplantierte, unreife embryonale Stammzellen nach partieller Hepatektomie einen hepatischen Phänotyp annehmen können²². In einem weiteren *in vivo* Experiment konnte durch die Transplantation embryonaler Stammzellen eine Faktor-IX-Defizienz bei Mäusen erfolgreich therapiert werden²⁴. Ungeachtet solch vielversprechender Ergebnisse hat diese Art von Zelltherapie beim Menschen zwei wesentliche Nachteile. Zum einen birgt die Verwendung humaner embryonaler Stammzellen ernsthafte ethische Probleme, da ihre Gewinnung die Zerstörung von frühen menschlichen Embryonen zur Folge hat. Zum anderen bringt ihr großes Regenerationspotential die Gefahr unkontrollierten Zellwachstums und sogar maligner Entartung mit sich^{23, 25}. Es ist bekannt, dass embryonale Stammzellen in der Zellkultur Aberrationen im Karyotyp akquirieren, die erstaunliche Parallelen mit genetischen Veränderungen in neoplastischen Zellen aufweisen²⁵. Die ethischen Einwände und Kontroversen, die damit verbundene eingeschränkte Verfügbarkeit und die mögliche Tumorigenität embryonaler Stammzellen sind daher stark limitierende Faktoren, die eine baldige klinische Anwendung dieser Zelltherapieform sehr unwahrscheinlich machen.

1.4 Leberregeneration durch adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen, die für Regenerations- und Heilungsprozesse verantwortlich sind, lassen sich in den meisten Organen und Geweben des menschlichen Körpers nachweisen²⁶⁻²⁹. Obwohl ihr Differenzierungspotential im Vergleich zu embryonalen Stammzellen deutlich limitiert ist, sind adulte Stammzellen zum einen durch die aktuelle ethische Debatte und zum anderen durch neueste Erkenntnisse, dass eine Differenzierung außerhalb des für diese Zellen typischen Gewebes möglich ist, verstärkt in das Interesse der regenerativen Medizin gerückt. Neueste Berichte über die Fähigkeit hämatopoetischer Stammzellen, außer Zellen des blutbildenden Systems auch Nerven⁻³⁰, Muskel⁻³¹, Lungenepithel⁻³² und Leberzellen⁻³³ zu generieren, widersprechen dem Paradigma der Zelldifferenzierung, nach dem Stammzellen sich nur in Zellen desselben Organsystems differenzieren können, aus dem sie stammen³⁴.

Für die praktische Anwendung haben dementsprechend adulte Stammzellen den Vorteil, dass ihre Gewinnung keine schweren ethischen Bedenken hervorruft und dass sich ihr breites Differenzierungspotential für therapeutische Zwecke als ausreichend herausstellen könnte. Die Transplantation adulter Stammzellen ist in zwei unterschiedlichen Situationen denkbar. Zum einen könnte eine allogene Zelltherapie durch eine Spende fremder Stammzellen, zum Beispiel bei akutem Organschaden, erfolgen. Dies hätte aber in den meisten Fällen eine medikamentöse Immunsuppression zur Folge. Die zweite Möglichkeit ist ein autologes Transplantationsverfahren, bei dem körpereigene Stammzellen zum Einsatz kämen und somit auf eine Immuntherapie verzichtet werden könnte. Die meisten adulten Stammzellen von potentiell therapeutischem Wert bei Leberversagen befinden sich entweder in der Leber selbst oder im Knochenmark. Auf die Existenz lebereigener Stammzellen wurde in einem Mausmodell schon Ende der 50er Jahre hingewiesen³⁵. Die als erstes beschriebene endogene Stammzellpopulation der Leber trägt die Bezeichnung „*oval cells*“ (OC). Morphologisch handelt es sich um kleine ovale Zellen, die sich primär in den terminalen Gallengängen, den so genannten Hering'schen Kanälen, befinden³⁶. Diese bipolaren Stammzellen können sich sowohl in Hepatozyten, wie auch in Cholangiozyten differenzieren und tragen Oberflächenmarker beider Zellarten^{37, 38}. Überdies exprimieren sie hämatopoetische Stammzellgene, wie C-kit, CD34 und Thy1 (CD90), was die Vermutung nahelegt, dass OC ihren Ursprung im Knochenmark haben³⁹. Hierzu gibt es aber widersprüchliche Daten, weshalb ihre Herkunft bisher nicht sicher geklärt werden konnte^{33, 40, 41}. Studien, in denen versucht wurde OC zu isolieren und in *in vivo*-Modellen zu transplantieren, konnten allerdings keinen wesentlichen therapeutischen Nutzen bei Leberschädigung feststellen⁴². Weiterhin ist es einigen Autoren gelungen, Stamm- und Progenitorzellen aus der Leber zu isolieren, die sich morphologisch, immunophänotypisch und im Genexpressionsmuster von OC unterscheiden⁴³⁻⁴⁵. Welche physiologische Bedeutung diese jedoch für die Leberregeneration haben, ist noch nicht geklärt.

Wie bereits erwähnt, gibt es einen verblüffenden Zusammenhang zwischen Regenerationsvorgängen in der Leber und dem Knochenmark. Das Knochenmark ist ein Reservoir verschiedener Stammzellpopulationen, von denen hämatopoetische Stammzellen (HSC) am besten erforscht sind. Diese exprimieren nicht nur Gene, die ebenfalls in „*oval cells*“ aktiviert sind³⁹, sondern können direkt an der Leberregeneration teilnehmen. Dies wurde zum ersten Mal von Petersen et al. beobachtet³³, als sie in einem Rattenmodell nach gegengeschlechtlicher Leber- beziehungsweise Knochenmarkstransplantation von

Spenderzellen stammende Leberzellen nachweisen konnten. Ein eindrucksvolles *in vivo*-Modell für Leberregeneration mit einem eindeutigen Überlebensvorteil durch Zelltherapie mit HSC ist von Lagasse et al. beschrieben worden⁴⁶. Hierbei wurde eine angeborene Tyrosinstoffwechselerkrankung bei Fumarylacetat-Hydrolase (FAH) *knock-out*-Mäusen durch eine vollständige Wiederherstellung der Leberfunktion nach Stammzelltransplantation erfolgreich therapiert. Die Empfängertiere überlebten ohne die ansonsten essentielle medikamentöse Behandlung, da bis zu 50 % der Hepatozyten aus hämatopoetischen Stammzellen gesunder Spender hervorgegangen waren. Die Spenderzellen besaßen ein intaktes FAH-Gen und hatten somit einen Selektionsvorteil gegenüber den defekten Hepatozyten. Das FAH-Mausmodell entspricht der Pathophysiologie einer hereditären Tyrosinämie Typ I beim Menschen, die mit fortschreitendem Leberversagen und erhöhtem Risiko für ein hepatozelluläres Karzinom einhergeht, und zeigt, dass Stammzelltherapie auch bei angeborenen Lebererkrankungen Anwendung finden könnte. In anderen Studien konnten auch Beweise für die Entstehung reifer Leberzellen aus Knochenmarkszellen beim Menschen erbracht werden. Theise et al⁴⁷. und andere Autoren⁴⁸⁻⁵⁰ haben eine geringe Zahl männlicher Hepatozyten in weiblichen knochenmarktransplantierten Patienten sowie umgekehrt weibliche Hepatozyten in männlichen Patienten, die einer Lebertransplantation mit weiblichen Spenderorganen zugeführt wurden, nachgewiesen. Der Mechanismus für die Entstehung intakter Leberzellen aus hämatopoetischen Stammzellen wurde zunächst als „Transdifferenzierung“ beschrieben, da man annahm, dass eine direkte Umwandlung dieser Stammzellen durch Stimuli im geschädigten Lebergewebe stattfindet¹⁴. Neue Erkenntnisse lassen aber darauf schließen, dass die Wiederherstellung der Leberfunktion in den meisten Modellen vor allem auf Zellfusion zwischen Hepatozyten und HSC zurückzuführen ist^{51, 52}. Das intakte Gen wird dabei in die defekte Leberzelle eingeschleust, die Zelle behält ihren hepatischen Phänotyp und nimmt ihre Funktion wieder auf.

Neben HSC beherbergt das Knochenmark eine weitere Stammzellpopulation, die mesenchymalen Stammzellen (MSC). MSC beteiligen sich nicht direkt an der Hämatopoese, sondern sind Bestandteil des Knochenmarkstromas. Sie besitzen ein enormes Proliferations- und Differenzierungspotential, können leicht isoliert werden und lassen sich im Gegensatz zu HSC *in vitro* in großen Zahlen expandieren. Diese Attribute machen mesenchymale Stammzellen zu einem vielversprechenden Kandidaten für Zelltherapie bei schweren Lebererkrankungen mit Organversagen.

1.5 Mesenchymale Stammzellen

Die Beschreibung mesenchymaler Stammzellen geht auf die Pionierarbeit von Friedenstein et al. zurück, die in den 60er und 70er Jahren durch anatomisch heterotope Knochenmarkstransplantation ein osteogenes Potential einer kleinen Zellsubpopulation des Knochenmarks beobachten konnten⁵³⁻⁵⁵. Die Zellen, auf die sie aufmerksam wurden, unterschieden sich von hämatopoetischen Zellen durch die Fähigkeit der Adhärenz in Kulturbedältern und ihre fibroblastenähnliche Morphologie⁵³. Darüber hinaus konnten sie außer Knochen auch andere mesodermale Gewebearten, wie Knorpel, Binde- und Fettgewebe generieren und bildeten in Kultur aus Einzelzellen diskrete Kolonien, so genannte *colony-forming unit fibroblastic* (CFU-F)⁵⁵. Die von Friedenstein entdeckten Zellen wurden später als „mesenchymale Stammzellen“ benannt⁵⁶. Ihr großes Differenzierungs- und Regenerationspotential erweckte jedoch erst Ende der 90er Jahre ein breites Interesse der regenerativen medizinischen Forschung⁵⁷. Seither wurde vielfach berichtet, dass MSC *in vitro* und *in vivo* nicht nur in Gewebe des Mesoderms (Knorpel, Knochen, Fett, Skelett-, Herzmuskel^{31, 58-60}), sondern auch des Ektoderms (Nerven⁶¹, Haut⁶²) und Endoderms (Lunge⁶⁰, Darm⁶¹, Pankreas⁶³, Leber^{61, 64, 65}) differenzieren können. In mehreren klinischen Studien konnte bereits ein signifikanter therapeutischer Effekt bei erworbenen Knorpel⁶⁶- und Knochendefekten⁶⁷, Herzinfarkt⁶⁸ und *Osteogenesis imperfecta*⁶⁹ beobachtet werden. Des Weiteren ist über mesenchymale Stammzellen bekannt, dass sie nach intravenöser Applikation in der Lage sind, spezifisch durch Zellmigration in geschädigtes Gewebe zu gelangen. Dies wurde in Tiermodellen bei Knochenfrakturen⁷⁰, Herzinfarkt⁷¹, cerebraler Ischämie⁷², Hautdefekten⁶² und nach radioaktiver Bestrahlung⁷³ beschrieben. Da eine große Schwierigkeit in der Entwicklung zelltherapeutischer Verfahren darin besteht, die Zellen in das Zielgewebe zu transportieren, ist die Eigenschaft der MSC, an den Ort der Organschädigung zu wandern, von großem Stellenwert. Ein weiterer bedeutender Vorzug einer Transplantation von MSC gegenüber anderen Zellpopulationen ist ihr besonderer Einfluss auf das Immunsystem des Empfängers. Es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass MSC sich nicht nur durch ihren speziellen Immunophänotyp und eine geringe Expression an kostimulatorischen Molekülen⁷⁴, sondern auch durch einen supprimierenden Effekt auf das fremde Immunsystem einer Abstoßung entziehen können⁷⁵⁻⁷⁷. Dies könnte für einen klinischen Einsatz von MSC bedeuten, dass eine allogene Transplantation dieser Zellen, zum Beispiel nach einem akuten Geschehen, keiner oder geringerer immunsuppressiven Therapie bedürfen würde.

Mesenchymale Stammzellen werden vor allem durch Aspiration aus dem Knochenmark gewonnen⁵⁷. In letzter Zeit wurden aber auch aus anderen Quellen MSC isoliert. Beschrieben wurden Isolierungsverfahren aus peripherem Blut⁷⁸, Nabelschnurblut²⁸, Zahnpulpa²⁹, Fettgewebe⁷⁹, Synovia⁸⁰, Muskel⁸⁰ und einer Vielzahl anderer Gewebe²⁶. Diese Berichte führten zu der Behauptung, dass es eine gemeinsame mesoendodermale Vorläuferzelle geben könnte, was jedoch stark umstritten ist⁸¹. Aus diesem Grund konzentrieren sich die vorliegenden Ausführungen ausschließlich auf MSC, die aus dem Knochenmark stammen.

Große Kontroversen verursacht auch der Name „mesenchymale Stammzelle“, aus folgenden Gründen: MSC sind eine sehr heterogene Zellpopulation⁸², die durch Plastikadhärenz in der Zellkultur gewonnen wird. Zudem ist nur eine geringe Anzahl der MSC in der Lage, CFU-F zu bilden und ihre Selbsterneuerungsfähigkeit ist nicht unbegrenzt⁸¹. Dies widerspricht der gängigen Definition einer Stammzelle. Auch liegt kein eindeutiger Beweis dafür vor, dass MSC pluripotente Eigenschaften haben und sich in der Tat keimblattübergreifend transdifferenzieren können. Wie im Falle von hämatopoetischen Stammzellen wird auch hier der Mechanismus der Zellfusion in Betracht gezogen^{15, 83}. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass sich in der heterogenen MSC-Population eine kleine Anzahl an „echten“ mesenchymalen Stammzellen befindet, die alle erforderlichen Stammzellkriterien erfüllt⁸⁴. Nach heutigem Wissensstand gibt es jedoch noch keine spezifischen Marker, die eine solche Zelle identifizieren könnten. Aus diesem Grund schlägt die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) vor, den Begriff „multipotent mesenchymal stromal cell“ als korrekte Bezeichnung für MSC zu verwenden⁸⁴. Des Weiteren legt die ISCT minimale Kriterien fest, die Zellen als MSC definieren sollen. Dazu gehören die Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen, ein bestimmter Immunophänotyp (siehe Kapitel 2.2.5) und die Fähigkeit Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten zu generieren⁸⁵. Da aber in dem überwiegenden Teil der wissenschaftlichen Literatur für die Abkürzung MSC immer noch der alte Name „mesenchymale Stammzelle“ verwendet wird, hält auch die vorliegende Arbeit an diesem Begriff fest, um einer eventuellen Verwirrung vorzubeugen.

Trotz der genannten kritischen Einwände bleiben MSC, dank ihrer unbestreitbaren breiten Differenzierungsfähigkeit und einzigartigen Eigenschaften, eine erfolgversprechende Quelle für zukünftige zelltherapeutische Behandlungsmethoden beim Menschen, die vor allem für die Leberregeneration von großer Bedeutung sein können. Es ist bereits in einigen Studien gelungen, aus Knochenmarks-MSC von Mäusen^{86, 87}, Ratten⁸⁸ und Menschen^{64, 89} durch *in vitro* Behandlung hepatozytenähnliche Zellen zu gewinnen. Lee et al. haben ein zweistufiges

Protokoll entwickelt⁶⁴, in welchem sie humane MSC zunächst mit *hepatocyte growth factor* (HGF), *epithelial growth factor* (EGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF), sowie anschließend mit Oncostatin M behandelt haben. HGF, EGF, bFGF und Oncostatin M sind Zytokine, die sowohl bei der Leberentwicklung als auch bei der Regeneration nach Leberschädigung eine entscheidende Rolle spielen. Die auf diese Weise behandelten MSC exprimierten nach mehreren Wochen leberspezifische Gene und zeigten *in vitro* für Hepatozyten charakteristische Funktionen, wie Albuminproduktion, Glykogenspeicherung, Harnstoffsekretion und Cytochrom-P450-Aktivität. Den noch ausstehenden Nachweis, dass MSC sich nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* in Hepatozyten differenzieren lassen, erbrachten Sato et al⁶⁵. Sie berichteten, dass humane MSC in einem xenogenen Tiermodell nach direkter Zelltransplantation in geschädigte Rattenlebern humane leberspezifische Zellmarker und Gene exprimieren, ohne dass Anzeichen für Zellfusion vorlagen. Weitere Berichte über erfolgreiche *in vivo*-Differenzierung von humanen MSC liegen für Studien mit Schafen⁹⁰ und Mäusen⁸⁷ vor. Aurich et al. haben MSC menschlicher Spender durch Kultivierung der Zellen in einem speziellen Wachstumsmedium in Hepatozyten differenziert und diese anschließend in Rag2-Mäuse transplantiert⁸⁷. Die humanen Spenderzellen behielten ihre leberspezifische Funktion und zeigten keinen Hinweis für Fusion mit Maushepatozyten. Auch die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, in einem *in vivo*-Transplantationsmodell den Beitrag mesenchymaler Stammzellen durch Transdifferenzierung oder Zellfusion an der Leberregeneration zu untersuchen. Hierfür wurden aber im Gegensatz zu den erwähnten Studien syngene MSC und eine spezielle Identifikationsmethode der applizierten Zellen verwendet (siehe Kapitel 1.7).

1.6 Stufenmodell der Leberregeneration

Die Leber ist die größte Drüse des Menschen, die eine enorme Eigenregenerationsfähigkeit besitzt. Sie besteht zu 80% aus Hepatozyten, die als Parenchymzellen für die Organfunktion verantwortlich sind, und zu 20% aus Gallengangs-, Endothel-, Ito-, Bindegewebs- und Kupferschen Sternzellen, sowie Lymphozyten¹⁶. Unter normalen Bedingungen befinden sich die meisten adulten Hepatozyten in der G0-Phase des Zellzyklus und teilen sich nicht. Um die physiologische Lebermasse zu erhalten, ist die Teilung von nur einer von 2000-3000 Zellen ausreichend⁸. Im Falle eines toxischen, infektiösen oder traumatischen Leberschadens sind Hepatozyten jedoch in der Lage wieder in die Mitose-Phase einzutreten und zu proliferieren. In Rattenversuchen wird ein Parenchymverlust von 70% nach partieller Hepatektomie postoperativ binnen einer Woche nach nur zwei Zellteilungen der verbleibenden Hepatozyten

vollständig wiederhergestellt¹⁶. Beim Menschen dauert dieser Regenerationsprozess bis zu einem Jahr, wobei sich die Stoffwechselfunktionen und der Metabolismus der Leber schon innerhalb von 2-3 Wochen nach einer ausgedehnten Hepatektomie erholen⁹¹. Darüber hinaus weiß man aus Studien mit Mäusen, dass Hepatozyten sich bis zu 70 mal replizieren und sogar seriell transplantieren lassen⁹². Allerdings ist dieses Regenerationspotential nicht unbegrenzt und erschöpft sich im Verlauf einer schweren Lebererkrankung. Ursachen hierfür sind Alterung der Hepatozyten durch Verkürzung der Telomere¹⁶ und direkte Inhibition der Replikation durch die vorliegende Erkrankung, zum Beispiel durch oxidativen Stress⁹³.

In diesem Fall gibt es in der Leber ein zweites Zellkompartiment, das die Regeneration übernehmen kann. Dabei handelt es sich um die so genannten „*oval cells*“ und hepatische Progenitorzellen (siehe Kapitel 1.4). Diese endogenen Leberstammzellen sind in den Periportalfeldern und Hering'schen Kanälen lokalisiert³⁶ und können sich in Gallengangs- und Leberzellen differenzieren³⁸. In Tiermodellen können diese Zellen identifiziert werden, indem man die Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten pharmakologisch durch Verabreichung toxischer Substanzen, wie 2-Acetylaminofluoren⁴¹, Retrorsine⁹⁴⁻⁹⁶ oder Tetrachlorkohlenstoff⁹⁷, unterbindet und die Versuchstiere einer partiellen Hepatektomie unterzieht.

Ferner gibt es Hinweise dafür, dass es in diesem zweistufigen Modell der Leberregeneration noch einen dritten Mechanismus gibt, an dem das Knochenmark eine entscheidende Rolle zu haben scheint. Wie bereits erwähnt, schlagen manchen Studien vor, dass „*oval cells*“ aus dem Knochenmark stammen³³. Überdies gibt es überzeugende Belege dafür, dass hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen auch *in vivo* Hepatozyten generieren können (siehe Kapitel 1.4). Manche Autoren gehen von einem Kreislauf zwischen Leber und Knochenmark aus, dem ein komplexer Mechanismus und das Zusammenspiel spezieller Zytokine, die bei Leberschädigung in den Blutkreislauf gelangen, zugrunde liegt^{13, 15, 47, 49, 83} (Darstellung des Leberfeinbaus siehe S. 87).

In diesem Zusammenhang wird aber auch deutlich, dass auf dem Gebiet der adulten Stammzellforschung noch sehr viele Fragen zu beantworten sind. Es muss zum Beispiel geklärt werden, wann Zellfusion oder Transdifferenzierung der Stammzellplastizität zugrunde liegt und unter welchen Bedingungen der entsprechende Mechanismus im Organismus abläuft. Weiterhin sollte die Erforschung der Interaktionen adulter Stammzellen mit der

Zellnische, in der sie sich befinden, vorangetrieben werden, da hierfür immer noch wenige Daten zur Verfügung stehen. Für einen möglichen klinischen Einsatz einer Zelltherapie ist vor allem aber auch das Verhalten transplanteder Zellen im lebenden Organismus relevant. Dies muss zunächst in Tierversuchen erforscht werden.

1.7 Etablierung eines Leberschädigungsmodells in der Ratte

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das regenerative Potential mesenchymaler Stammzellen *in vivo* im Vergleich mit Hepatozyten in einem chronischen Leberschädigungsmodell zu evaluieren. Hierzu wurde ein syngenes Rattenmodell entwickelt, in dem sowohl MSC als auch Hepatozyten transplantiert wurden. Die Identifizierung von aus Spenderzellen hervorgegangenen Leberzellen sollte unabhängig vom Entstehungsmechanismus möglich sein. Dieses Modell spiegelt ein Leberschädigungsmuster wider, wie es auch in einer schweren chronischen Lebererkrankung beim Menschen zu beobachten ist. Versuchstiere wurden hierfür kontinuierlich mit einem der leberspezifischen Toxine Tetrachlorkohlenstoff und Allylalkohol behandelt, um einen starken Regenerationsstimulus in der Leber zu erzeugen. Beide Giftstoffe führen zur Nekrose von Hepatozyten, einer schweren Entzündungsreaktion und als Folge zum Parenchymverlust des Organs^{97, 98}. Durch den entstandenen Zellschaden werden Zytokine freigesetzt, die zum einen eine Immunantwort des Organismus hervorrufen und zum anderen aber auch Regenerationsmechanismen durch Hepatozyten und „*oval cells*“ initiieren⁹¹. Ebenso scheint die Migration von mesenchymalen Stammzellen an den Ort eines Gewebeschadens zytokinvermittelt zu sein⁷². Der induzierte Leberschaden ist also im Rahmen eines zelltherapeutischen Ansatzes Grundvoraussetzung für eine Ansiedlung von MSC, das so genannte „*homing*“, und eine spätere eventuelle Differenzierung der Zellen.

Da jedoch in einer gesunden Leber ein erlittener Zellschaden zunächst durch Hyperplasie von Hepatozyten repariert wird¹⁶, ergibt sich das Problem, dass eine Proliferation transplanteder Spenderzellen durch native Leberzellen möglicherweise überdeckt wird. Um den Spenderzellen einen Selektionsvorteil zu verschaffen, wurde bei den Experimenten zum Teil der Mitoseinhibitor Retrorsine verwendet. Es handelt sich dabei um ein Pyrrolizidinalkaloid, dessen Metabolite selektiv Leberzellen an dem Abschluss der Zellteilung hindern⁹⁹. Durch die pharmakologische Hemmung der Eigenregeneration der Leber wird ein bedeutender pathologischer Zustand bei schweren Lebererkrankungen des Menschen nachempfunden.

Als Marker zur Identifikation der transplantierten Zellen ist das Enzym Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) gewählt worden, das auch als das Oberflächenprotein CD26 bekannt ist. Das hier verwendete Modell orientiert sich an den Arbeiten von Laconi et al., die F344 Ratten und eine DPPIV-defiziente Variante dieses Rattenstammes dazu nutzten, um das Verhalten von Wildtyphepatozyten von Spendertieren in DPPIV-negativen Empfängerlebern zu untersuchen⁹⁴⁻⁹⁶. Die zwei Varianten der F344 Ratten unterscheiden sich nur durch eine Punktmutation im DPPIV-Gen und sind ansonsten genetisch identisch. DPPIV kommt vor allem auf Epithelzellen vor und wird daher auf Hepatozyten exprimiert¹⁰⁰, jedoch nicht von mesenchymalen Stammzellen, die aber trotzdem das intakte Gen besitzen. Folglich würde für die Fragestellung der hier vorliegenden Arbeit eine neu auftretende Expression von CD26 in einem DPPIV-defizienten Tier, das mit MSC von DPPIV-positiven Spendern transplantiert wurde, bedeuten, dass eine Transdifferenzierung der Spenderzellen oder eine Fusion mit Empfängerhepatozyten stattgefunden hat.

Zusammenfassend wurde also ein congenes Tiermodell mit chronischer Leberschädigung entwickelt, in dem der Beitrag von mesenchymalen Stammzellen und Hepatozyten an der Organregeneration studiert werden konnte. Ein spezieller Zellmarker wurde gewählt, um nicht nur die applizierten MSC und Hepatozyten in den Empfängerlebern zu identifizieren, sondern auch den eventuellen Übergang der MSC von mesenchymalen zu epithelialen Zellen nachzuweisen. Dies wäre sowohl im Falle von Transdifferenzierung als auch Fusion der MSC möglich.

1.8 Fragestellung

Das in der hier vorliegenden Arbeit entwickelte Rattenmodell sollte folgende Punkte klären:

1. Welche Eigenschaften und Charakteristika haben aus dem Knochenmark gewonnene MSC *in vitro*?
2. Wie verhält es sich mit der Distribution, Lokalisation und dem Verbleib der MSC in der Leber nach Transplantation?
3. Was für Verhalten zeigen transplantierte Hepatozyten bei chronischer Leberschädigung durch unterschiedliche hepatotoxische Stimuli *in vivo*?
4. Welchen Einfluss haben unterschiedliche hepatotoxische Stimuli auf das Verhalten und die Differenzierungsfähigkeit syngener MSC bei chronischer Leberschädigung *in vivo*?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial, Eindeck- und Zellkulturmedien

| | |
|---|--------------------------------|
| Auatex: | Merck, Darmstadt |
| Cryo-Tubes: | Corning Inc., USA |
| Deckgläser: | VWR International, Darmstadt |
| DMEM: | Biochrom AG, Berlin |
| Einmal-Injektions-Kanülen (20 G, 26 G, 27 G): | Becton Dickinson, USA |
| Einmalküvetten: | Sarstedt, Nümbrecht |
| Eukitt: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| FACS-Röhrchen: | Falcon/Becton Dickinson, USA |
| Fluorescence Mounting Medium: | Dako, Hamburg |
| Glasgewindeschraubröhrchen: | Serolab, Aidenbach |
| Glaskapillaren: | Sarstedt, Nümbrecht |
| Glyceringelantine: | Merck, Darmstadt |
| HBM: | Labinova, Schweden |
| HBSS-Medium: | Biochrom AG, Berlin |
| Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-well, Flachboden): | Becton Dickinson, USA |
| Mikrotiterplatten (96-well, Rundboden): | Corning Inc., USA |
| Objektträger: | Gerhard Menzel, Braunschweig |
| Pipetten (5 ml) | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Pipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml) | Corning Inc., USA |
| RPMI-Medium: | Invitrogen, USA |
| Spritzen (3 ml, 5 ml, 10 ml): | Becton Dickinson, USA |
| Sterilfilter (Minisart NML 0,2 µm): | Sartorius, Göttingen |
| Tissue-Tek: | Sakura, Niederlande |
| Zentrifugenröhrchen, (15, 50 ml): | Greiner Bio-One, Frickenhausen |
| Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²): | Corning Inc., USA |

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

| | |
|----------------------------------|-----------------------------|
| Aceton: | Merck, Darmstadt |
| Alcian-Blue-Färbung: | Bio-Optica, Italien |
| Allylalkohol: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| 3-Amino-9-Ethylcarbazol: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Ammoniumchlorid: | Merck, Darmstadt |
| Ascorbinsäure: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| β-Glycerolphosphat: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Boratpuffer: | Merck, Darmstadt |
| BrdU | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Calciumchlorid: | Merck, Darmstadt |
| Chloralhydrat: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Collagenase H: | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Dexamethasone: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Diethylether: | Merck, Darmstadt |
| Eosin: | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure: | Merck, Darmstadt |
| Ethanol: | Merck, Darmstadt |
| Fast-Blue-BB-Salz: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| FCS: | Biochrom AG, Berlin |
| Formaldehyd: | Merck, Darmstadt |
| Insulin: | Sanofi-Aventis, Frankreich |
| 3-Isobutyl-1-Methylxanthin: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| ITS-Premix: | Becton Dickinson, USA |
| Gly-pro-methoxy-β-naphthylamide: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Hämalaun: | Merck, Darmstadt |
| Kaliaun: | Merck, Darmstadt |
| Methanol: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natriumacetat: | Merck, Darmstadt |
| Natriumchlorid: | Merck, Darmstadt |
| Natriumjodat: | Merck, Darmstadt |
| Natriumpyruvat: | Invitrogen, USA |
| Natriumthiosulfat: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Natronlauge: | Merck, Darmstadt |

| | |
|--------------------------|---------------------------|
| N,N-Dimethylformamid: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Normales Rattenserum: | Dianova, Hamburg |
| Normales Ziegenserum: | PromoCell, Heidelberg |
| PBS Dulbecco: | Biochrom AG, Berlin |
| Penicillin/Streptomycin: | Invitrogen, USA |
| Percoll: | Amersham Biosciences, USA |
| Pyrogallol: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Retrorsine: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Red-Oil-O-Lösung: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Salzsäure: | Merck, Darmstadt |
| Silbernitrat: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| SSC-Puffer: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Tetrachlorkohlenstoff: | Acros Organics, Belgien |
| TGF- β 1: | R&D Systems, Wiesbaden |
| Tris: | Merck, Darmstadt |
| Trypanblau: | Merck, Darmstadt |
| Trypsin-EDTA: | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Von-Kossa-Färbung: | Bio-Optica, Italien |
| Wasserstoffperoxid: | Merck, Darmstadt |
| Xylol: | Merck, Darmstadt |
| Zitronensäure: | Merck, Darmstadt |

2.1.3 Antikörper und Standardkonzentrationen

| Antikörper-Spezifität | Spezies | Bezugsquelle |
|-----------------------|---------|--|
| CD3 | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| CD4 | Ratte | Caltag, Burlingame, CA, USA |
| CD25 | Ratte | Caltag, Burlingame, CA, USA |
| CD26 | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA BD Pharmingen, San Diego, CA, USA |
| CD45 | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| CD49b | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |

| | | |
|--|-------|--|
| CD73 | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| CD80 | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| CD86 | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| CD90 (Thy1) | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| CK18 | Ratte | Abcam, Cambridge, Großbritannien |
| RT1A^I (MHC I) | Ratte | Originalquelle: Prof. Wonigeit, Hannover, Deutschland |
| RT1B (MHC II) | Ratte | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| GAM-POX Ziege-anti-Ratte IgG POX konjugiert | Ziege | BD Pharmingen, San Diego, CA, USA Roche Diagnostics, Basel, Schweiz |

Tabelle 2-1 Verwendete Antikörper.

2.1.4 Geräte

| | |
|--|-------------------------------------|
| Analysewaage (LC 210): | Labor Center, Nürnberg |
| Brutschrank (Cytoperm): | Heraeus, Hanau |
| Digitalkamera für Mikroskop: | Zeiss, Jena |
| Durchflusszytometer (FACSCalibur): | Becton Dickinson, USA |
| Kryostat (Frigocut 2800 E): | Leica, USA |
| Magnetrührer (RCT B): | IKA-Werke, Staufen |
| Lichtmikroskope: | Zeiss, Jena |
| Peristaltische Pumpe (Multifix constant): | Alfred Schwinherr, Schwäbisch Gmünd |
| Pipetten (5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl): | Eppendorf, Hamburg |
| Rüttler (Vortex-Genie 2): | Scientific Industries, USA |
| Sterilbank (Lamin-Air): | Heraeus, Hanau |
| Zentrifuge (Megafuge 1.0 R): | Heraeus, Hanau |
| Wasserbad (SW-20C): | Julabo, Seelbach |

2.1.5 Instrumente und sonstige Materialien

| | |
|--------------------------|----------------------|
| Nadelhalter: | Aeskulap, Tuttlingen |
| Neubauer-Zählkammer: | Sarstedt, Nümbrecht |
| Pinzette, anatomisch: | Aeskulap, Tuttlingen |
| Pinzette, chirurgisch: | Aeskulap, Tuttlingen |
| Präparierschere: | Aeskulap, Tuttlingen |
| Prolene (3/0, 4/0) | Ethicon, USA |
| Tabotamp | Ethicon, USA |
| Zellsieb (40 µl, 125µl): | Neolap, Heidelberg |
| Zellspatel: | TPP, Schweiz |

2.1.6 PC-Programme

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| Adobe Photoshop 7.0: | Adobe |
| Acrobat Reader 8.0: | Adobe |
| Endnote X1.0.1: | Thomson ResearchSoft. |
| Microsoft Word 2007: | Microsoft Corp. |
| Microsoft Excel 2007: | Microsoft Corp. |
| WinMDI 2.8 | Joseph Trotter |

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung und Kultur von mesenchymalen Stammzellen

Für die vorliegende Arbeit wurden MSC aus dem Knochenmark nach einem leicht abgewandelten Protokoll von Pittenger et al. isoliert⁵⁷. Das allgemeine Prinzip dieser MSC-Gewinnung besteht darin, alle mononukleären Knochenmarkszellen in Zellkulturflaschen auszuplattieren und die plastikadhärente Zellpopulation weiter zu kultivieren.

2.2.1.1 Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark

Für die Gewinnung von Knochenmark wurden zunächst die Versuchstiere in eine tiefe Äthernarkose versetzt und durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden den Tieren die langen Röhrenknochen *Femur*, *Tibia* und *Humerus* entnommen und in HBSS-Medium gesammelt. Danach wurden die Epiphysen aufgebrochen, mit einer Kanüle angebohrt und der Markraum mit einer 5 ml-Spritze gespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde resuspendiert und in 175 cm² Zellkulturflaschen mit DMEM (10% FCS; 1% Penicillin/Streptomycin) ausplattiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden nicht adhärente Zellen aus der Kultur durch Mediumwechsel entfernt. Adhärente Zellen wurden zwei Wochen nach Beginn der Kultur mit 0.5% Trypsin-EDTA geerntet und in neue Kulturflaschen ausplattiert.

2.2.1.2 Langzeitkultur von MSC

Für die Langzeitkultur wurden MSC in *Dulbecco modified Eagle Medium* (DMEM) mit hoher Glukosekonzentration (4500 mg/l) und Glutamin, das mit 10% fetalem Kalbserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin supplementiert wurde, kultiviert. Bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Zellen mit 0.5% Trypsin-EDTA abgelöst und im Verhältnis 1:3 in neue 175 cm² Zellkulturflaschen passagiert. MSC wurden bis maximal Passage 25 kultiviert. Für Tierversuche wurden deutlich niedrigere Zellpassagen (weniger als Passage 10) verwendet.

2.2.2 Klassische Differenzierung von MSC

Die multipotenten Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen werden durch ihre Fähigkeit definiert, sich in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten differenzieren zu können⁸⁵. Um zu verifizieren, ob es sich bei der aus dem Rattenknochenmark gewonnenen

plastikadhärenten Zellpopulation um MSC handelt, wurden diese Zellen *in vitro* in die drei verschiedenen Zelllinien differenziert.

2.2.2.1 Differenzierung in Adipozyten

Hierzu wurden MSC in 12- oder 24-well Platten ausgesät und bis zur Konfluenz im Expansionsmedium (siehe Kapitel 2.2.1.2) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für zwei Tage im Medium ohne FCS belassen, um einen Wachstumsstillstand zu erreichen. Zur Induktion der Differenzierung wurden die Zellen mit Expansionsmedium ohne FCS, das mit Insulin (15 U/ml), Dexamethasone (1×10^{-6} M), Ziegenserum (5 ml/100 ml) und 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (0.1 mg/ml) versetzt worden war, für drei Tage kultiviert. Zur Zellreifung schloss sich im zweiten Schritt die Kultivierung der MSC für fünf Tage im Expansionsmedium ohne FCS mit Insulin (15 U/ml) an.

Der Nachweis für die Differenzierung von MSC in Adipozyten wurde mittels Red-Oil-O-Histologie erbracht. Hierfür wurden die Zellen in den Wells mit kaltem PBS gewaschen und mit 10% Formaldehyd bei einer Temperatur von 4°C über Nacht fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur zwei Stunden mit 5 mg/ml Red-Oil-O Lösung inkubiert. Für die Dokumentation der Ergebnisse wurden die Präparate mit einer Digitalkamera abfotografiert.

2.2.2.2 Differenzierung in Osteoblasten

Im ersten Schritt wurden MSC mit einer Zelldichte von 15.000 Zellen/cm² auf 6-well Platten in DMEM ohne FCS für 24 Stunden belassen. Anschließend wurde die Differenzierung mit osteogenem Medium (DMEM mit 0.1 µM Dexamethason, 0.3 mM Ascorbinsäure, 10 mM β-Glycerolphosphat) eingeleitet. Während der zweiwöchigen Kultivierung der Zellen wurde jede Woche zweimal ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach diesem Zeitraum erfolgte der Nachweis einer osteogenen Differenzierung mittels von-Kossa-Färbung. Hierfür sind die Zellen mit 5% Silbernitrat-Lösung bedeckt, für 40 Minuten mit Weißlicht und im nächsten Schritt zur Inkubation für zwei Minuten mit UV-Licht bestrahlt worden. Nach dem Waschen der Zellen mit destilliertem Wasser wurden diese für 5 Minuten in 1% Pyrogallol inkubiert und nochmals gespült. Überschüssiges Silbernitrat wurde in einem Waschschrift mit einer 5% Natriumthiosulfat-Lösung nach 5 Minuten entfernt.

2.2.2.3 Differenzierung in Chondroblasten

Für die chondrogene Differenzierung wurden 200.000 MSC in ein 15 ml Plastikröhrchen bei 1200 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Das auf diese Weise gebildete Zellpellet wurde anschließend für 16 Tage im Differenzierungsmedium kultiviert. Dabei handelte es sich um DMEM mit 4500 mg/l Glucose, das mit 0.1 µM Dexamethason, 0.2 µM Ascorbinsäure, 0.2 µM Natriumpyruvat, 10 ng/ml *transforming growth factor-β1* (TGF- β1) und 1% ITS-Premix (Insulin, Transferrin, Selen) ergänzt wurde. Nach 16 Tagen wurde das Zellpellet in Tissue-Tek® eingebettet und schockgefroren. Zum Nachweis der von den Zellen produzierten Glucosaminoglykanen in der Interzellulärsubstanz erfolgte eine Alcian-Blue-Färbung (detaillierte Protokolle siehe S. 81-84).

2.2.3 *in vitro*-Stimulation von MSC in Kultur

In einem weiteren Ansatz wurden MSC *in vitro* mit einem speziell für die Kultivierung von Hepatozyten entwickelten Medium (*Hepatocyte Basal Medium*, HBM) stimuliert, um ihre Fähigkeit zur Leberregeneration nach Zelltransplantation potentiell zu verstärken. Hierfür wurden die Zellen (Passage 5-6) für zwei Wochen mit HBM kultiviert, welches *human epithelial growth factor* (hEGF), Hydrocortison, Insulin, Transferrin und Ascorbinsäure enthielt. Anschließend wurden sie geerntet und für die Applikation im Tiermodell bereitgestellt.

2.2.4 Gewinnung und Aufbereitung von Hepatozyten

Zur Evaluierung des Verhaltens von transplantierten Hepatozyten *in vivo* wurden Einzelzell-suspensionen hergestellt. Hierfür wurden Hepatozyten nach dem Kollagenase-Perfusionsprinzip isoliert¹⁰¹.

Die Versuchstiere wurden unter Äthernarkose durch zervikale Dislokation getötet. Danach ist das Abdomen eröffnet und die *Vena cava inferior* und *Vena portae* freigelegt worden. In die *Vena cava inferior* wurde eine 26-gauge Nadel eingeführt, die über einen Schlauch mit einer peristaltischen Pumpe verbunden war. Zusätzlich ist die Pfortader durchtrennt worden. Im Anschluss erfolgte die Leberperfusion in vier Schritten. Nacheinander wurde die Leber mit folgenden Lösungen retrograd perfundiert: HBSS-Medium, HBSS-Medium mit 0.5 mmol EDTA, HBSS-Medium und HBSS-Medium mit 0.5 mg/ml Collagenase H und 5 mmol CaCl₂.

Anschließend konnte die so vorbehandelte Leber herausgenommen und in eine Petrischale mit RPMI-Medium mit FCS überführt werden. So wurde durch vorsichtiges Schaben mittels Skalpell eine Zellsuspension hergestellt, die dann durch ein Zellsieb (40 µl) grob aufgereinigt wurde. Nach mehreren Waschschritten (bei 500 rpm, 4°C, 3 min) mit RPMI (ohne FCS) und PBS in der Zentrifuge wurden die Einzelzellen durch den isotonischen Percoll-Gradienten (bei 2000 rpm, 4°C, 10 min) von Bindegewebsresten und kernlosen Zellen getrennt. Die Einzelzellsuspension wurde noch zweimal mit PBS gewaschen. Vor der Weiterverwendung der Hepatozyten wurde die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.5 Immunophänotypisierung von MSC und Hepatozyten

Eines der Kriterien der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) für MSC ist ein spezifischer Immunophänotyp der Zellen. Diese müssen zum Beispiel CD73 und CD90 exprimieren, dürfen aber kein CD34, CD45 oder MHC II als Oberflächenmarker aufweisen⁸⁵. Diese Zelleigenschaften wurden mit der Durchflusszytometrie bestimmt.

2.2.5.1 Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch *Fluorescence-Activated Cell Sorting* (FACS) genannt, ist eine Methode zur Analyse und Differenzierung von Einzelzellen in Suspension auf Grundlage ihrer Größe, Granularität und der Konstellation ihrer Oberflächenantigene durch Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Dabei fließen einzelne Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer aus Glas und werden von der Seite mit einem Laserlicht angestrahlt. Das erste Merkmal, das in der Durchflusszytometrie gemessen wird, ist das Streulicht. Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht je nach Größe und Anzahl der Strukturen in ihrem Inneren eine unterschiedliche Menge an Streulicht. Die Größe einer Zelle korreliert mit der Streuung parallel zum Laserstrahl, die im so genannten „*forward scatter*“ (FSC) durch Fotodetektoren erfasst wird. Kleine Zellen verursachen ein kleines Vorwärtsstreulichtsignal, große Zellen ein großes. Die Granularität korreliert mit der Streuung, die rechtwinklig zum Laserstrahl mit dem „*side scatter*“ (SSC) gemessen wird, wobei viele Zellorganellen, wie zum Beispiel Lysosomen, mehr Seitwärtsstreulicht erzeugen.

Zur Detektion von Zelloberflächenmolekülen werden monoklonale Antikörper verwendet, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Solche Fluorochrome sind beispielsweise Phycoerythrin (PE) oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC), welche bei Anregung durch einen

Laserstrahl Licht einer definierten Wellenlänge emittieren. Fotodetektoren messen dieses Licht spezifisch und lassen dadurch eine qualitative, sowie semiquantitative Aussage über die durch die Antikörper markierten Antigene auf der Zelloberfläche zu. Die gemessene Leuchtstärke gibt Aufschluss über die Zahl der gebundenen Antikörper pro Zelle. Das Durchflusszytometer gibt das durch PE und FITC emittierte Licht in der ersten (FL1) bzw. zweiten Fluoreszenz (FL2) an. Die Ergebnisse werden üblicherweise in einer Grafik, dem so genannten „Dotplot“ (Punktwolke) dargestellt, wobei je zwei unterschiedliche Eigenschaften gegeneinander aufgetragen werden (siehe Abb. 2.1). Auf diese Weise kann zum Beispiel die Granularität im SSC gegen die Größe im FSC dargestellt und verglichen werden (Darstellungen von FACS-Messungen siehe S. 84).

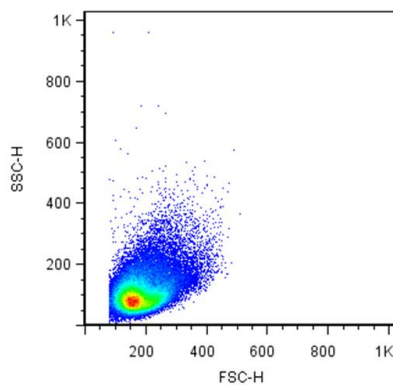


Abbildung 2-1 MSC Lewis im forward sideward scatter (auf lebende Zellen gated).

2.2.5.2 Oberflächentypisierung von MSC und Hepatozyten

Mesenchymale Stammzellen (Passage 5) wurden bei 4 °C für 30 Minuten mit Kombinationen aus aufgereinigten FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD4, CD25, CD26, CD45, CD49b, CD73, CD80, CD86, CD90 (Thy1), CK18, RT1A^I (MHC I) und RT1B (MHC II) inkubiert. Frisch gewonnene Hepatozyten wurden im gleichen Verfahren auf die Expression von CD3, CD4, CD25, CD26, CD45, CD73, CD80, CD86, CD90 (Thy1), CK18, RT1A^I (MHC I) und RT1B (MHC II) getestet. Die Quantifizierung erfolgte mit dem FACS-Calibur-Laserdurchflusszytometer.

2.2.5.3 Auswertung von FACS-Daten

Die erhaltenen FACS-Daten wurden mit dem PC-Programm WinMDI 2.8 ausgewertet, wobei zunächst die Zellgröße und Granularität in einem Streudiagramm dargestellt wurden. Tote (PI-negative) Zellen wurden dabei durch ein so genanntes „open wide gate“ ausgeschlossen. Anschließend erfolgte die Darstellung beider Fluoreszenzen gegeneinander. Separate gates wurden für einzelne Subpopulationen definiert.

2.2.6 Versuchstiere

Für die *in vivo* Versuche sind Ratten des Stammes Fischer 344 (MHC-Haplotyp: RT1^{llvl}, Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland) verwendet worden. Die Zucht DPPIV-defizienter F344 Ratten wurde mit Zuchttieren etabliert, die von der Brown University, Providence, USA bezogen wurden.

In Rahmen von Zelldistributionsversuchen wurden darüber hinaus auch Wistar Ratten (MHC *wild type*, Charles River Inc. Sulzfeld, Deutschland) und Lewis Ratten (MHC-Haplotyp: RT1^{lll}) verwendet.

Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen im Tierhaus der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg gehalten und wogen zu Versuchsbeginn zwischen 170 und 250g.

Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) ist ein ubiquitäres Glykoprotein, das in allen Organen durch Endothelzellen, Drüsenzellen und aktivierte Lymphozyten exprimiert wird. Dieses multifunktionale Enzym hat seine Aufgaben in der Verdauung, dem Metabolismus, der Immunregulation, im endokrinen System und der Zelladhäsion¹⁰⁰. Die Expression von DPPIV auf Hepatozyten ist einzigartig, da sie sich nur auf den apikalen Abschnitt der Zellen beschränkt⁹⁴. Trotz der Vielzahl von Funktionen scheint dieses Protein nicht essentiell für das Überleben eines Lebewesens zu sein. In DPPIV-defizienten F344 Ratten wird das Enzym auf keiner Zelle exprimiert.

2.2.7 Anästhesie und Narkotika

Für die Applikation von Toxinen zur Leberschädigung und zur Durchführung operativer Eingriffe wurden die Versuchstiere mit Diethyläther narkotisiert, um Schmerzfreiheit und Relaxation zu erreichen. Die Inhalationsnarkose wurde in einem Glastopf durchgeführt, wobei die Tiere bis zum Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe darin belassen wurden. Bewusstlosigkeit wurde anhand der fehlenden Bewegung der Tiere, des Ausbleibens des Lidschlags und der Abflachung der Atmung festgestellt.

2.2.8 Schädigung der Leber

Die Schädigung der Leber stellt einen Regenerationsreiz dar und löst die Proliferation der Hepatozyten aus. In der vorliegenden Studie ist ein prolongiertes subakutes Leberversagen mit Organschädigung induziert worden.

Die folgenden Anforderungen sollten hierbei erfüllt sein:

1. eine einfache und reproduzierbare Anwendung
2. eine schnelle selektive und effektive Schädigung der Leber
3. eine lang anhaltende Proliferationsstimulation der Hepatozyten

Im Folgenden werden die einzelnen Methoden vorgestellt.

2.2.8.1 Tetrachlorkohlenstoff

Tetrachlorkohlenstoff (CCl_4) gehört zu den chemischen Verbindungen aus der Reihe der Chlorkohlenwasserstoffe und ist gut fettlöslich. Nach der Aufnahme in den Körper wird es in der zentrolobulären Zone der Leberläppchen metabolisiert. Leberzellen bauen das CCl_4 durch Monooxygenasen ab, wobei unter anderem das hochreaktive Trichlormethylradikal entsteht¹⁰². Dies führt zu einer Peroxidation von Lipiden im endoplasmatischen Retikulum, zur Schädigung der Zellmembran, einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration und schließlich zum Zelltod¹⁰³. Nach Ablauf von 36 bis 48 Stunden ist eine ausgedehnte Nekrose mit akuter Entzündungsreaktion im Bereich der Zentralvene die Folge, der sich eine Proliferation von intakten Hepatozyten anschließt⁹⁸.

Eine chronische Vergiftung mit CCl_4 kann zu einer Leberzirrhose mit subakuter Organinsuffizienz führen, da seine kurzlebigen Metabolite bei fortlaufender Exposition durch den Ausgangsstoff eine kontinuierliche Schädigung des Leberparenchyms mit fibrotischer Folgereaktion verursachen⁹⁸. Die Eigenschaften dieses Giftstoffes werden deshalb zur Etablierung künstlicher Modelle für akute oder chronische Leberschädigung in Tierexperimenten verwendet.

In der vorliegenden Arbeit wurde Versuchsratten 14 und 28 Tage nach durchgeführter Zelltransplantation Tetrachlorkohlenstoff intraperitoneal injiziert. Hierfür wurde zunächst eine Lösung von CCl_4 in Speiseöl im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Tiere erhielten 0.6 ml des Toxins pro Kilogramm ihres Körpergewichtes. Da CCl_4 sich vor allem in Anwesenheit von Feuchtigkeit unter Einwirkung von Licht und Wärme zersetzt und dabei das Giftgas Phosgen bildet, musste es immer trocken und lichtgeschützt verwahrt werden.

2.2.8.2 Allylalkohol

Allylalkohol (AA) ist eine klare, farblose und bei Raumtemperatur flüssige, organische Verbindung, die sich ebenfalls wie Tetrachlorkohlenstoff durch eine starke hepatotoxische Wirkung auszeichnet. Im Gegensatz zu CCl_4 wird AA in der Leber jedoch vor allem durch

Hepatozyten aufgenommen, die sich in der Nachbarschaft der Periportalfelder befinden¹⁰⁴. Der Ausgangsstoff ist zwar inaktiv, wird aber in den Leberzellen durch die Alkoholdehydrogenase zu Acrolein oxidiert, bei dem es sich um das eigentliche Zellgift handelt. Die Toxizität von Acrolein ist abhängig von der Konzentration des Antioxidans Glutathion (GSH) in der Zelle und führt erst bei schwerwiegendem Abfall von GSH zum Zelltod. Acrolein bindet an zelluläre Makromoleküle, ändert deren strukturelle und funktionelle Eigenschaften und leitet somit den Untergang des Hepatozyten ein¹⁰⁵. Die Schädigung der Leber durch Allylalkohol zeichnet sich auf histologischer Ebene durch eine massive Nekrose und Entzündung im Bereich der Periportalfelder aus. Aus diesem Grund wird AA in Tierversuchen zur Untersuchung von Regenerationsvorgängen in der Außenzone der Leberläppchen angewandt⁹⁸.

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente wurde 0.62 mmol AA pro Kilogramm des Körpergewichtes einer Ratte einen Tag vor Zellinjektion intraperitoneal appliziert. Im weiteren Verlauf wurde das Gift alle drei Tage bis zum Versuchsende mit der halben Dosis (0.31 mmol/kg des KG) verabreicht.

Darstellungen des Feinbaus der Leber finden sich auf S. 87.

2.2.8.3 Retrorsine

Die Leber ist ein Organ mit einer erstaunlichen Regenerationskraft, das einen Parenchymverlust von bis zu zwei Drittel innerhalb weniger Wochen wieder vollständig ausgleichen kann. Verantwortlich für diesen regenerativen Effekt sind Hepatozyten, für welche die Noxe einen Proliferationsstimulus darstellt. Durch Zellteilung wird in nur wenigen Mitosezyklen die ursprüngliche Lebermasse wiederhergestellt. Um Spenderzellen einen Überlebens- und Wachstumsvorteil gegenüber nativen Hepatozyten zu ermöglichen, wurde die Substanz Retrorsine zur Blockade der Eigenregenerationsfähigkeit der Leber nach einer Schädigung durch CCl₄ oder AA verwendet. Retrorsine ist ein Pyrrolizidinalkaloid aus der Pflanze *Senecio vulgaris* (gewöhnliches Greiskraut), das selektiv bei Leberzellen die Mitose unterbindet^{94, 95, 99}. Hepatozyten nehmen Retrorsine auf und verstoffwechseln es zu bioaktiven Metaboliten, die Proteine und DNS alkylieren⁶⁰. Dies führt wahrscheinlich zu einem Zellzyklusarrest in der späten S-Phase und/oder der G₂-Phase. Die Leberzelle kann zwar die Mitose nicht mehr beenden, es ist aber nicht vollständig gesichert und kontrovers, ob sie noch in der Lage ist DNS zu replizieren⁹⁶. Darüber hinaus weisen *in vivo*-Ergebnisse mit Retrorsine auf eine rasche Metabolisierung und eine Wochen bis Monate andauernde antimitotische Wirkung dieser Substanz hin^{95, 99}.

Retrorsine liegt als Festsubstanz vor und muss daher für die intraperitoneale Applikation gelöst werden. Die Ratten erhielten 30 mg Retrorsine pro Kilogramm KG, was bei einem mittleren Körpergewicht von 200g etwa 6 bis 7 mg i.p. pro Einzeltier entsprach. Als Erstes wurde die benötigte Menge Retrorsine abgewogen und in ein Becherglas gegeben, in dem sich bereits VE-Wasser befand, so dass 10 mg Retrorsine pro ml VE-Wasser vorlagen. Da Retrorsine im neutralen Milieu schwer löslich ist, wurde das Gemisch mit einer 1:10-verdünnten 37% HCl-Lösung tropfenweise auf pH 2,5 titriert. In diesem sauren Milieu ließ sich Retrorsine mit einem Magnetrührer auflösen. Um die Lösung wieder auf einen physiologischen pH-Wert zu bringen, wurde sie mit 1M NaOH auf pH 7,0 neutralisiert, wobei Retrorsine gelöst blieb. Danach wurde eine 0,15 molare NaCl-Lösung durch Zugabe von kristallinen NaCl hergestellt. Diese Retrorsinelösung wurde innerhalb weniger Stunden appliziert. Für einen optimalen Effekt wurden zwei Applikationen im Abstand von 14 Tagen durchgeführt. Bis zur weiteren Behandlung der Tiere wurde 14 Tage nach der letzten Retrorsineapplikation abgewartet.

2.2.9 Zelltransplantation

Für die Zelltransplantation wurde je nach Versuch entweder ein intraportaler oder intrahepatischer Injektionsweg gewählt. Hierfür wurden pro Versuchstier $2 \cdot 10^6$ Hepatozyten oder mesenchymale Stammzellen gewonnen und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung lichtmikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Bis zur Injektion wurde die Zellsuspension kurzzeitig in einer 1 ml Spritze auf Eis gelegt.

Zur Eröffnung des Abdomens wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Für eine intrahepatische Injektion wurde der mediane oberflächliche Leberlappen mit Hilfe von Wattestäbchen leicht herausluxiert. In den so exponierten Lappen konnten Zellen direkt ins Leberparenchym mit einer 27-gauge Nadel appliziert werden. Um einen Reflux der injizierten Zellen zu vermeiden, wurde die Nadel erst nach ca. 30 Sekunden wieder entfernt. Die Injektionsstelle wurde mit einem Prolene-Faden markiert, um später das Wiederfinden der Zellen zu erleichtern.

Um bei der intraportalen Zellapplikation einen Zugang zur *Vena portae* zu erlangen, wurde nach der Laparotomie der proximale Teil des Dünndarms und das *Colon transversum* nach rechts geklappt und in eine feuchte, aufgefaltete Kompresse geschlagen. In die so exponierte

Pfortader wurde nun mit einer 27-gauge Nadel 1 ml Zellsuspension gespritzt, wobei der rechte und mediane Leberlappen gleichzeitig mit einem Wattestäbchen herausluxiert wurden. Um die Blutung nach der Injektion zu stoppen, wurde für einige Minuten Druck auf die Einstichstelle ausgeübt. Bei fortbestehender oder sehr starker Blutung wurde ein kleines Stück Kollagenfließ (Tabotamp®) aufgelegt.

Nach Sicherstellung der Blutstillung wurde das Abdomen in zwei Schichten zugenäht. Mit einer fortlaufenden Naht wurden zunächst die Bauchwandfaszien miteinander vernäht, danach folgte eine Hautnaht.

2.2.10 Tiermodelle

Für die Untersuchung des Nutzens einer Zelltherapie mit mesenchymalen Stammzellen bei subakutem Leberversagen wurden verschiedene Leberschädigungsmodelle gewählt, die sich vom Grundprinzip her gleichen (siehe Abb. 2.2). In allen Fällen wurde mit toxischen Stimuli eine hepatische Schädigung (2) mit nachfolgender Zelltherapie (3), bestehend entweder aus Hepatozyten oder MSC, durchgeführt. Zusätzlich wurde in manchen Versuchsgruppen Retrorsine zur Regenerationsblockade der Leber (1) verabreicht. Die Empfängertiere unterschieden sich von den F344-Spenderratten auf genetischer Ebene lediglich durch das Fehlen des Enzyms DPPIV. Dieser epitheliale Marker stellte einen Indikator für eine erfolgreiche Zellimplantation (4) in der Leber dar.

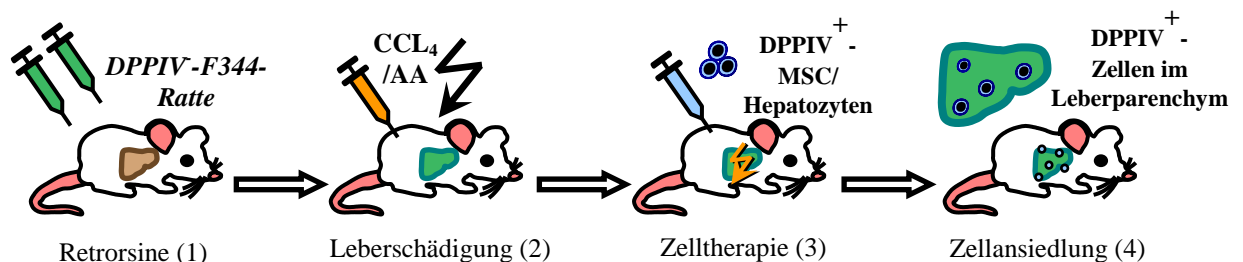


Abbildung 2-2 Das Grundprinzip des DPPIV-Tiermodells.

In Kontrollversuchen mit Hepatozyten sollten zunächst durch die Variation der Schädigung die optimalen Bedingungen für eine Zellimplantation und –proliferation ermittelt werden.

In den folgenden Abschnitten wird nun im Detail auf den Aufbau und die funktionellen Unterschiede der Tiermodelle eingegangen.

2.2.10.1 Leberschädigung durch CCl₄ in Kombination mit Retrorsine

Das Prinzip der folgenden Versuche beruhte auf der Kombination von:

1. Leberregenerationsblockade durch Retrorsine
2. Leberschädigung durch CCl₄
3. Zelltherapie mit Hepatozyten bzw. MSC

In diesem Ansatz wurden DPPIV-defiziente F344 Versuchstiere mit 30 mg Retrorsine/kg KG zweimal im Abstand von je zwei Wochen vor Zellapplikation vorbehandelt. Die Leber der Tiere wurde mit 0,6 ml CCl₄/kg KG 14 und 28 Tag nach der Operation geschädigt. Am Tag 0 wurden $2 \cdot 10^6$ Hepatozyten oder mesenchymale Stammzellen von DPPIV-positiven F344 Ratten intraportal injiziert. In zwei Kontrollgruppen wurde nur eine Hepatozytenproliferationsblockade ohne Leberschädigung durchgeführt.

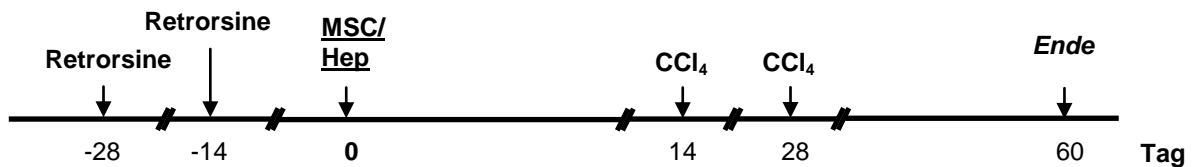


Abbildung 2-3 Behandlungsregime mit Retrorsine und Schädigung durch CCl₄.

Am Tag 30 bzw. 60 nach der Zellapplikation wurden die Tiere getötet und aufgearbeitet. Dabei wurden alle Leberlappen entnommen und in flüssigem Stickstoff bei -80°C eingefroren. Anschließend sind pro Tier zwischen 20 und 60 Kryoschnitte angefertigt worden, die enzymhistochemisch und immunhistologisch analysiert wurden.

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl, verwendeter Zellart und Behandlungsregime befindet sich in Tabelle 2.2.

| Tierzahl <i>N</i> | transplantierte Zellen | Applikations- stelle | Retrorsine | Leber- schädigung | Versuchs- dauer |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|------------|----------------------|--------------------|
| 6 | Hepatozyten | <i>V. portae</i> | Ja | -- | 30 d |
| 6 | MSC | <i>V. portae</i> | Ja | -- | 60 d |
| 4 | Hepatozyten | <i>V. portae</i> | Ja | CCl ₄ | 60 d |
| 5 | MSC | <i>V. portae</i> | Ja | CCl ₄ | 60 d |

Tabelle 2-2 Versuchsgruppen bei Retrorsinevorbehandlung mit oder ohne Schädigung durch CCl₄.

2.2.10.2 Leberschädigung durch CCl₄ ohne Retrorsine

Die folgenden Versuche dienten zur Evaluierung der optimalen Schädigungsbedingungen für die Zelltherapie und wurden nur mit Hepatozyten durchgeführt.

Das Prinzip dieser Versuche beruhte ausschließlich auf der Kombination von:

1. Leberschädigung durch CCl₄
2. Zelltherapie mit Hepatozyten

Hier wurden DPPIV-defiziente F344 Ratten mit 0,6 ml CCl₄/kg KG am 14. und 28. Tag nach der Zelltransplantation behandelt. Es sind $2 \cdot 10^6$ Hepatozyten von DPPIV-positiven F344 Ratten intraportal appliziert worden.

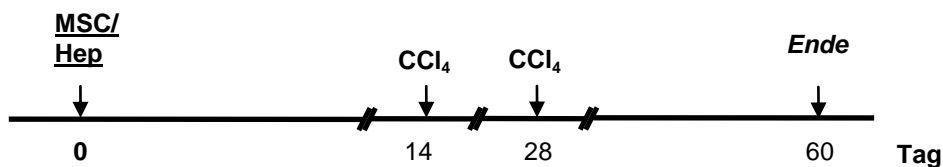


Abbildung 2-4 Behandlungsregime mit Schädigung durch CCl₄ ohne Retrorsine.

Am Tag 60 nach der Zellinjektion wurde der Versuch beendet und die Lebern auf gleiche Weise aufgearbeitet, wie oben beschrieben. Pro Versuchstier sind zwischen 20 und 60 Kryoschnitte zur enzymhistochemischen und immunhistologischen Analyse hergestellt worden. Eine Zusammenstellung dieser Versuchsgruppe mit Tieranzahl, verwendeter Zellart und Behandlungsregime befindet sich in Tabelle 2.3.

| Tierzahl <i>N</i> | transplantierte Zellen | Applikations- stelle | Retrorsine | Leber- schädigung | Versuchs- dauer |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|------------|----------------------|--------------------|
| 3 | Hepatozyten | <i>V. portae</i> | Nein | CCl ₄ | 60 d |

Tabelle 2-3 Versuchsgruppe mit Schädigung durch CCl₄ ohne Retrorsine.

2.2.10.3 Leberschädigung durch AA in Kombination mit Retrorsine

Das Prinzip der folgenden Versuche beruhte analog zum Versuch mit CCl₄ auf der Kombination von:

1. Leberregenerationsblockade durch Retrorsine
2. Leberschädigung durch Allylalkohol
3. Zelltherapie mit Hepatozyten bzw. MSC bzw. *in vitro*-stimulierten MSC

DPPIV-defizienten F344 Ratten wurden 30 mg Retrorsine/kg KG 28 und 14 Tage vor Zelltransplantation verabreicht. Die Leberschädigung erfolgte mit 0,62 mmol AA/kg KG einen Tag vor der Operation und wurde jeden dritten Tag mit 0,31 mmol AA/kg KG über die gesamte Versuchsdauer fortgeführt. Am Tag 0 wurden $2 \cdot 10^6$ Hepatozyten, mesenchymale Stammzellen oder in Hepatozytenmedium kultivierte MSC von DPPIV-positiven F344 Tieren intraportal bzw. direkt in die Leber injiziert.

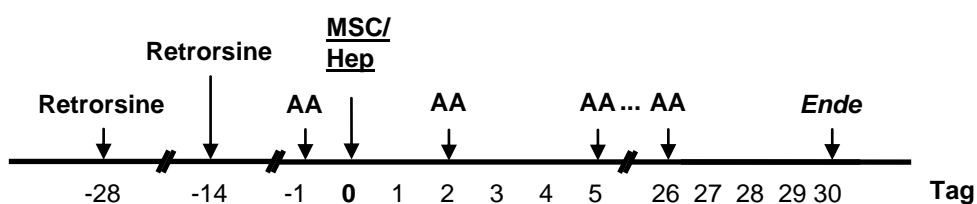


Abbildung 2-5 Behandlungsregime mit Retrorsine und Schädigung durch AA.

Am Tag 30 nach der Zellapplikation wurden die Tiere getötet und aufgearbeitet (s.o.).

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl, verwendeter Zellart und Behandlungsregime befindet sich in Tabelle 2.4.

| Tierzahl <i>N</i> | transplantierte Zellen | Applikations- stelle | Retrorsine | Leber- schädigung | Versuchs- dauer |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|------------|----------------------|--------------------|
| 3 | Hepatozyten | <i>V. portae</i> | Ja | AA | 30 d |
| 3 | Hepatozyten | Leber | Ja | AA | 30 d |
| 3 | MSC | <i>V. portae</i> | Ja | AA | 30 d |
| 3 | stimulierte MSC | <i>V. portae</i> | Ja | AA | 30 d |

Tabelle 2-4 Versuchsgruppen bei Retrorsinevorbehandlung mit Schädigung durch AA.

2.2.10.4 Leberschädigung durch AA ohne Retrorsine

Für die folgenden Versuche wurde auf eine Leberregenerationsblockade verzichtet und es wurde nur durchgeführt:

1. Leberschädigung durch Allylalkohol
2. Zelltherapie mit Hepatozyten bzw. MSC bzw. *in vitro*-stimulierten MSC

Die Leber wurde mit 0,62 mmol AA/kg KG am Tag -1 vor Zellapplikation und im weiteren Versuchsverlauf jeden dritten Tag mit 0,31 mmol AA/kg KG geschädigt. $2 \cdot 10^6$ Hepatozyten,

mesenchymale Stammzellen oder in Hepatozytenmedium kultivierte MSC DPPIV-positiver F344 Ratten sind intraportal bzw. intrahepatisch appliziert worden.

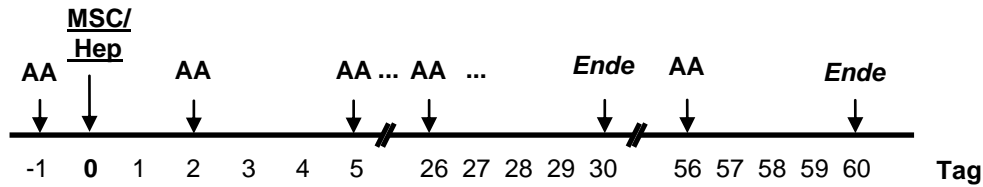


Abbildung 2-6 Behandlungsregime mit Schädigung durch AA ohne Retrorsine.

Das Versuchsende wurde auf Tag 14, 30 bzw. 60 festgelegt und die Tiere wurden nach dem gleichen Schema wie oben beschrieben weiterverarbeitet.

Eine Zusammenstellung der Versuchsgruppen mit Tieranzahl, verwendeter Zellart und Behandlungsregime befindet sich in Tabelle 2.5.

| Tierzahl <i>N</i> | transplantierte Zellen | Applikations- stelle | Retrorsine | Leber- schädigung | Versuchs- dauer |
|----------------------|---------------------------|-------------------------|------------|----------------------|--------------------|
| 2 | Hepatozyten | <i>V. portae</i> | Nein | AA | 30 d |
| 1 | Hepatozyten | <i>V. portae</i> | Nein | AA | 60 d |
| 3 | Hepatozyten | Leber | Nein | AA | 30 d |
| 7 | MSC | <i>V. portae</i> | Nein | AA | 30 d |
| 3 | MSC | <i>V. portae</i> | Nein | AA | 60 d |
| 2 | MSC | Leber | Nein | AA | 14 d |
| 9 | MSC | Leber | Nein | AA | 30 d |
| 3 | MSC | Leber | Nein | AA | 60 d |
| 2 | stimulierte MSC | <i>V. portae</i> | Nein | AA | 30 d |

Tabelle 2-5 Versuchsgruppen mit Schädigung durch AA ohne Retrorsine.

2.2.11 Zelldistribution

Um das Verhalten der applizierten mesenchymalen Stammzellen in der Leber nach Zelltransplantation in Abhängigkeit von der Zeit zu analysieren, wurden Distributionsversuche im Tiermodell durchgeführt. Hierfür wurden MSC markiert (s.u.) und in Analogie zu den Zelltherapieversuchen intraportal gespritzt. Es wurden Analysezeitpunkte

festgelegt (2 Stunden, 2 Tage, 7 Tage nach Zellinjektion), an denen die Versuchstiere getötet und die Lebern entnommen wurden. Anschließend erfolgte auf histologischer Ebene die quantitative Bestimmung positiver Zellen. Im Folgenden soll im Detail auf die hierfür verwendeten Methoden eingegangen werden.

2.2.11.1 Distribution BrdU-markierter MSC

Dieser Versuch ist mit und ohne gleichzeitige Leberschädigung durch AA durchgeführt worden. MSC wurden zwei Tage vor Zellinjektion mit 5-bromo-2-desoxyuridine (BrdU) markiert, indem 10 µl BrdU-Stammlösung (1 mM) in 1 ml Kulturmedium gelöst wurde. BrdU ist ein Thymidinanalogon, das während der Zellreplikation in die DNA eingebaut wird und sich nach einer speziellen Aufbereitung des Gewebes immunhistologisch nachweisen lässt. In Vorversuchen wurde eine BrdU-Aufnahmerate von 90% etabliert. Am Tag 0 wurden die Zellen geerntet und intraportal den Versuchstieren, die z.T. mit AA konditioniert wurden, injiziert. Nach 2 Stunden, 2 Tagen und 7 Tagen wurden die Tiere getötet und dann für die quantitative Analyse weiterverarbeitet. Ein einzelnes Tier, das einer AA-Behandlung unterzogen wurde, ist erst nach 30 Tagen getötet worden.

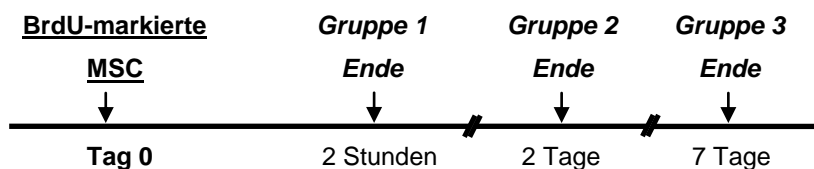


Abbildung 2-7 Zeitlicher Aufbau des Distributionsversuches mit BrdU-markierten MSC.

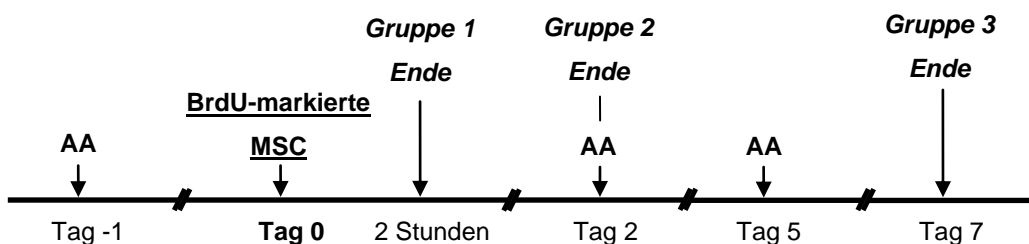


Abbildung 2-8 Zeitlicher Aufbau des Distributionsversuches mit BrdU-markierten MSC und gleichzeitiger Leberschädigung durch AA.

Für die Auswertung sind aus den Rattenlebern Kryoschnitte angefertigt worden. Diese wurden über Nacht in 70% Ethanol belassen, anschließend mehrfach mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur in 0.6% H₂O₂-Lösung für 30 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren

Waschschritt mit PBS wurden die Schnitte in 50% Formamid/SSC-Puffer-Lösung verbracht und für 75 Minuten bei 65⁰C aufbereitet. Anschließend folgte eine fünfminütige Inkubation in SSC-Puffer (2x), der sich die Aufbereitung des Lebergewebes mit HCl anschloss. Hierzu wurden die Schnitte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln einer 1 M HCl-Lösung ausgesetzt und dann zur Neutralisation in 2 M Boratpuffer-Lösung getaucht. Es schlossen sich daran erneut mehrere Waschschritte mit PBS an, bevor mit einer immunhistochemischen Färbung gegen BrdU begonnen werden konnte (siehe Kapitel 2.2.13).

Die Auswertung der Anti-BrdU-Färbung erfolgte lichtmikroskopisch. Hierfür wurden alle positiven Zellen innerhalb eines Leberschnittes ausgezählt, wobei mindestens 6 Präparate von einem Versuchstier ausgewertet wurden. Es ist penibel darauf geachtet worden, dass keine Mehrfachzählung durchgeführt wurde und dass Zellen, die sich innerhalb von Gefäßlumina oder Nekrosearealen befanden, nicht mit in das Gesamtergebnis eingegangen sind.

2.2.11.2 Distribution GFP-transfizierter MSC

Um die Ergebnisse aus der BrdU-Färbung zu verifizieren, wurde auf eine zweite Methode zur Zelldistribution, die auf Immunfluoreszenz durch das *green fluorescent protein* (GFP) beruht, zurückgegriffen. Hierfür wurden Zellen, die mit dem GFP-Gen transfiziert wurden*, bis zur Passage 5 kultiviert, geerntet und für die Zelltransplantation bereitgestellt. Diese ist am Tag 0 erfolgt, wobei die Analysezeitpunkte wieder nach 2 Stunden, 2 Tagen und 7 Tagen festgelegt wurden. Auf eine Leberschädigung wurde verzichtet. Die hergestellten Kryoschnitte wurden mit einem speziellen Medium (Dako Fluorescence Mounting Medium) eingedeckt, das eine Autofluoreszenz der Gewebeproben dämpfen sollte.

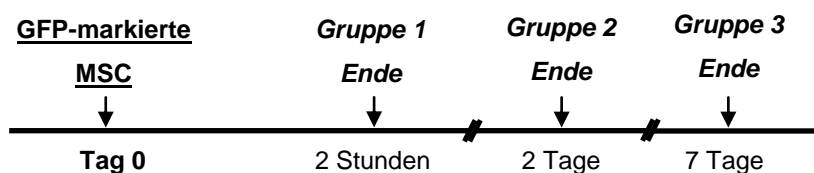


Abbildung 2-9 Zeitlicher Aufbau des Distributionsversuches mit GFP-transfizierten MSC.

Das GFP ist ein Protein, das erstmals aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* isoliert werden konnte und bei Exposition mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert¹⁰⁶. Es ist im Gegensatz zu anderen Flouorchromen, wie zum Beispiel FITC (Fluoreszeinisothiocyanat),

* Der Zellklon III B6 wurde freundlicherweise von Dr. C. Lange, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

nicht phototoxisch und wird in der Molekularbiologie sowohl als Marker für Proteinexpression und –lokalisation, als auch für den Nachweis bestimmter Zelltypen *in vitro* und *in vivo* eingesetzt¹⁰⁷. Hierfür wird die GFP-DNA mit sogenannten Vektoren (meist Viren) in die Zellen eingebracht und so die Expression des GFP als Fusionsprodukt mit zelleigenen Proteinen initiiert. Dieser Vorgang wird als „Transfektion“ (über Plasmide) oder „Transduktion“ (über Viren) bezeichnet. Die markierten Zellen lassen sich anschließend leicht durch die Fluoreszenzmikroskopie nachweisen.

2.2.12 Histologische Färbungen

2.2.12.1 Hämatoxylin-Eosin Färbung auf Kryoschnitten

Zur Herstellung von Kryoschnitten wurde das in flüssigem Stickstoff schockgefrorene histologische Material zunächst in einer Matrix (Tissue-Tek®) bei -20°C fixiert. Im Anschluss daran wurden in einem Kryostaten Schnitte in einer Schichtdicke von 3-5 µm hergestellt und auf Objektträgern aufgenommen. Die so angefertigten Präparate wurden für 2 bis 24h bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann entweder sofort weiterverarbeitet oder langfristig bei -20°C aufbewahrt.

Für die weitere Verwendung wurden die Schnitte 5 Minuten in Aceton fixiert. Die Kryostatschnitte wurden in Träger gegeben und in einer Färbekammer für 7 Minuten in Hämalun gefärbt. Nach dem Übertragen der Träger in eine Spülwanne folgte ein Waschvorgang für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser (sog. Bläuen). Dabei wurde die Spülwanne mehrmals gewechselt. Als nächstes folgte der Färbeschritt mit Eosin für 30 Sekunden. Nach einem kurzen Waschschrift in Leitungswasser wurden die Schnitte für 1 Minute in 70% Alkohol, für 2 Minuten in 96% und 100% Alkohol entwässert. Die Fixierung wurde zweimal für 1 Minute in Xylol durchgeführt. Danach wurden die Präparate mit Kunstharz (Eukitt®) eingedeckt und zum Abdampfen unter einen Abzug gelegt. Die langfristige Lagerung erfolgte bei Zimmertemperatur.

Hämalun wurde wie folgt hergestellt: Lösen von 1 g Hämatoxilin in 1000 ml *Aqua dest.*, anschließend Erwärmen und Zugabe von 0,2 g Natriumjodat (NaJO₃) und 50 g Kaliaun (Aluminiumkaliumsulfat). Nach Beimischen von 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure kommt es zu einem Farbtonumschlag ins Violette. Eosin wurde durch Mischung von 0,5-1 % Eosinlösung mit einem Tropfen Essigsäure hergestellt.

2.2.12.2 DPPIV-Enzymhistochemische Färbung

Kryostatschnitte sind zunächst mit 95% Ethanol für 5 Minuten fixiert und anschließend luftgetrocknet worden. Im folgenden Schritt wurden die Gewebeschnitte mit einem Substrat aus 100 mmol/l Trismaleate (pH 6.5), 100 mmol/l NaCl, 1 mg/ml Fast-Blue-BB-Salz und 0,5 mg/ml Gly-pro-methoxy- β -naphthylamide bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit PBS und eine Hämalaun-Kerngegenfärbung nach Weigert. Die Schnitte wurden mit Aquatex® eingedeckt und unter dem Lichtmikroskop (siehe Kapitel 2.2.14) ausgewertet.

2.2.13 Immunhistologische Färbungen

Durch die Immunhistologie lassen sich definierte Antigene mittels monoklonaler Antikörper auf Zellen nachweisen, die im Gewebeverband als Schnitte vorliegen. Jeder Antikörper kann damit spezifische Proteine und somit Merkmale von Zellen sichtbar machen. Der Immunhistologie liegt das Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion zugrunde. Im ersten Schritt wird der so genannte Primärantikörper auf das Präparat aufgebracht, der spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Im zweiten Schritt bindet der Sekundärantikörper, der mit einem Enzym konjugiert ist, welches eine Färbereaktion katalysiert, an den Primärantikörper. Zum Schluss wird der Farbstoff appliziert, der von dem Enzym des Sekundärantikörpers zu einem Produkt umgesetzt wird, das den Antigen-Antikörper-Komplex sichtbar macht.

Zunächst wurden 3-5 μ m dicke Kryoschnitte hergestellt, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dann entweder sofort verarbeitet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Für die Weiterverarbeitung wurden die Schnitte mit reinem Aceton für 5-6 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die nachfolgenden Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Um unspezifische Reaktionen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Präparate mit heterologem Serum der Spezies des Sekundärantikörpers (NGS) für 15-30 Minuten vorinkubiert. Auf diese Weise erreicht man eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen und verringert die unspezifische Hintergrundfärbung. Nach Abgießen des NGS wurde der Primärantikörper jeweils in der optimalen Verdünnung auf das Präparat aufgebracht und inkubiert (Zeiten siehe Tabelle 2-6). Zur Sicherstellung einer spezifischen Bindung an das zu untersuchende Antigen handelte es sich ausschließlich um monoklonale Antikörper (mAk). Anschließend wurde der nicht gebundene Primärantikörper durch drei Waschschriffe mit PBS entfernt. Danach folgte die

Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung, wobei die Kryostatschnitte vollständig bedeckt und für 60 Minuten in der Färbekammer belassen wurden. Der Sekundärantikörper war stets mit Peroxidase (POX) konjugiert. Um eine möglichst spezifische Färbung durch die Beseitigung überschüssigen Antikörpers zu gewährleisten, schlossen sich wieder drei Waschschrte mit PBS an. Danach erfolgte die Substratentwicklung durch Peroxidase. Hierfür wurde das Substrat wie folgt angesetzt: 3-Amino-9-Ethylcarbazol wurde in N,N-Dimethylformamid gelöst und unter Rühren zu 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5,2) hinzugegeben. Nach Zugabe einer 35% Wasserstoffperoxid-Lösung wurde der Ansatz filtriert. Die Präparate wurden für 10-20 Minuten inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gewaschen.

Der Substratentwicklung schloss sich eine Hämalan-Kerngegenfärbung an. Zum Schluss wurden die so behandelten Präparate mit Kaiser Glycerin-Gelatine (wässrig, 50°C) dauerhaft eingedeckt (Protokoll siehe S. 85-86).

| Absättigen | Primärer Antikörper | Sekundärer Antikörper | POX-Substrat |
|---|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| je 100 µl NGS (1:10) 15-30 min | CD 26 (1:200) 60 min | GAM-POX (1:50) + NRS (1:50) 60 min | je 200 µl 20 min |
| | CK 18 (1:200) 60 min | GAM-POX (1:50) + NRS (1:50) 60 min | |
| | Anti-BrdU (1:400) über Nacht | GAM-POX (1:50) + NRS (1:50) 60 min | |

Tabelle 2-6 Konzentrationen (in Klammern) der verwendeten Antikörper. NGS = normales Ziegenserum, NRS = normales Rattenserum.

2.2.14 Lichtmikroskopische Auswertung

Zur Auswertung, ob sich DPPIV⁺-Spenderzellen in der DPPIV⁻-Empfängerleber nachweisen lassen, wurden die DPPIV-histochemisch, beziehungsweise CD26-immunhistologisch gefärbten Schnitte von mindestens zwei geschulten, unabhängigen Beobachtern am Lichtmikroskop beurteilt. Die Zahl der ausgewerteten Präparate pro Tier schwankte zwischen zehn und 60, in Abhängigkeit vom angewandten Protokoll für die Zelltransplantation. Zum Teil sind mehrere Leberlappen eines Versuchstieres analysiert worden. Lagen positive Ergebnisse in der immunhistologischen Färbung vor, wurde zur quantitativen Unterscheidung die maximale Akkumulation positiver Zellen pro Schnitt bestimmt. Entsprechendes gilt auch

für die CK18-Immunhistologie. In diesem Fall wurden jedoch deutlich weniger Schnitte ausgewertet. Für die Lichtmikroskopische Auswertung der Anti-BrdU-Färbung siehe auch Zelldistribution Kapitel 2.2.11.1.

Zur Dokumentation wurden die meisten Präparate mit einer Digitalkamera abfotografiert. Kontrast und Helligkeit dieser Bilder wurde mit Hilfe von Adobe Photoshop 7.0 optimiert.

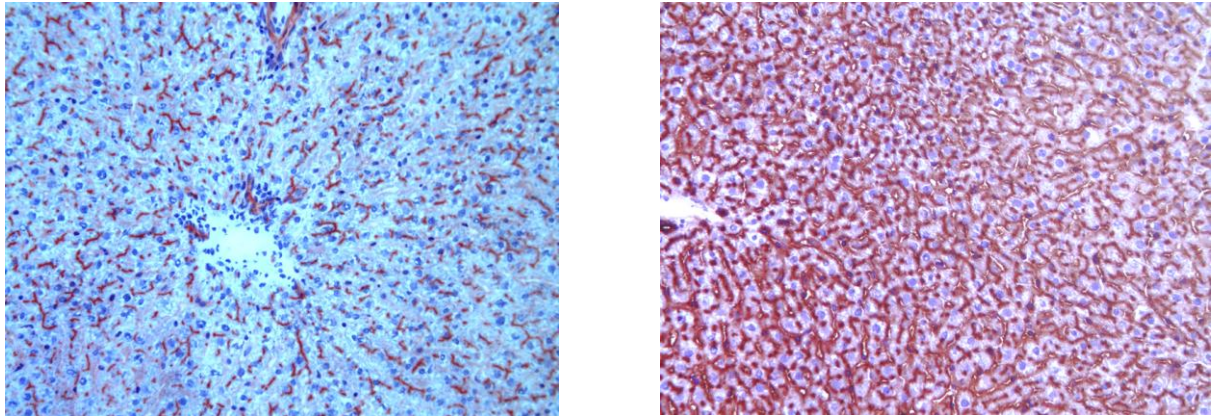


Abbildung 2-10 Positivkontrollen an Leberschnitten DPPIV⁺-F344-Ratten: DPPIV-Enzymhistochemische Färbung (links; 100x Vergr.) und CD26-Immunhistochemische Färbung (rechts; 100x Vergr.); Hämalan-Kerngegenfärbung.

3 Ergebnisse

3.1 Langzeitkultur von MSC

MSC, die aus adultem Rattenknochenmark durch Plastikadherenz gewonnen wurden, wiesen in Kultur eine spindelförmige, fibroblastenähnliche Morphologie auf, die sich durch längliche, verzweigte Zellausläufer und einen schmalen Zytoplasmasaum um den zentral lokalisierten, rundlich-ovalen Zellkern auszeichnete (siehe Abb. 3.1). In ihrem Wachstumsverhalten zeigten die Zellen die Fähigkeit zur Bildung einzelner Kolonien aus fibroblastenähnlichen Zellklonen, ein Phänomen, welches unter dem Begriff *colony-forming unit fibroblast* (CFU-F) beschrieben wurde (siehe Abb. 3.1). Aus jeder primären Zellpopulation konnten mindestens 17 und maximal 25 Passagen gewonnen werden. Hohe Sterblichkeit und geringe Teilungsfähigkeit der MSC waren limitierend für eine weitere Kultivierung.

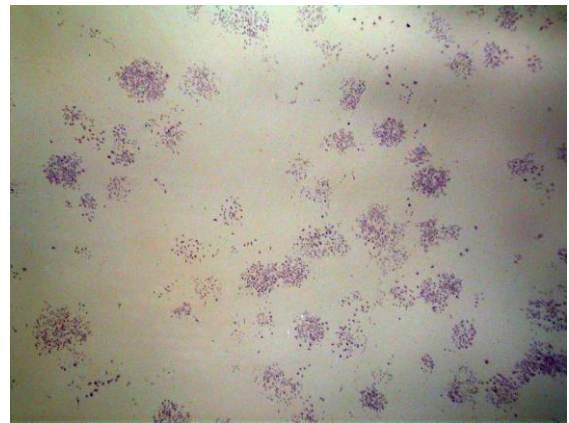


Abbildung 3-1 MSC in Kultur: spindelförmige, fibroblastenähnliche Zellen (links; 200x Vergr.) mit koloniebildendem Wachstumsverhalten CFU-F (rechts; 40x Vergr.); HE-Färbung.

MSC erwiesen sich in Zellkultur als leicht zu kultivieren, zeigten die typische Morphologie mesenchymaler Bindegewebszellen und hatten die Eigenschaft aus einem Zellklon größere Kolonien zu formen.

3.2 Klassische Differenzierung von MSC

Die Gewinnung plastikadhärenter Zellen aus dem Knochenmark ist wenig spezifisch und hat zur Folge, dass es sich bei den erhaltenen Zellen um eine heterogene Zellpopulation handelt. Für diese Arbeit wurde die Differenzierungsfähigkeit der MSC in unterschiedliche mesodermale Gewebe geprüft. Im Folgenden werden Einzelheiten zur Differenzierung beschrieben.

3.2.1 Differenzierung in Adipozyten

Nach der Zugabe von Differenzierungsmedium für Adipozyten (siehe Kapitel 2.2.2.1) veränderte sich die Morphologie der MSC. Die Zellen verloren ihr spindelförmiges Aussehen und nahmen oval-rundliche Formen an. Nach Ablauf von acht Tagen präsentierte sich das Zytoplasma voluminöser und der eher rundliche Zellkern war nunmehr exzentrisch lokalisiert. Innerhalb des Zytoplasmas bildeten sich unterschiedlich große Vakuolen, die sich durch eine Red-Oil-O-Lösung anfärben ließen und somit als Fetteinschlüsse identifiziert werden konnten (siehe Abb. 3.2).

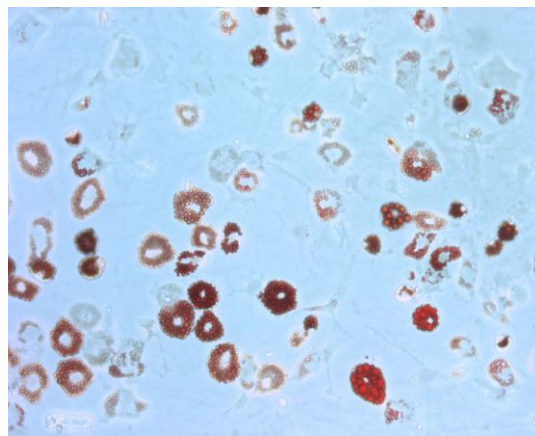
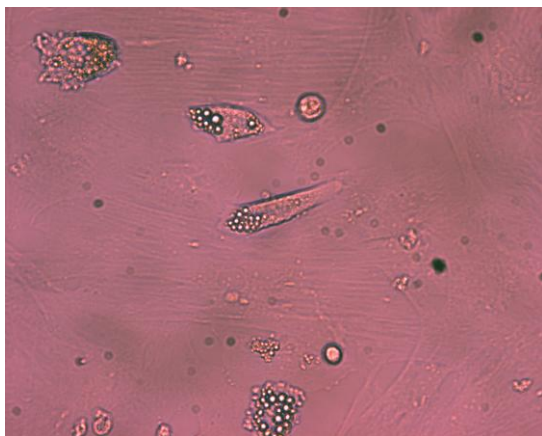


Abbildung 3-2 Differenzierung von MSC in Adipozyten: ungefärbte (links; 400x Vergr.) und mit Red-Oil-O-Lösung behandelte (rechts; 200x Vergr.) Fettvakuolen enthaltende Zellen.

3.2.2 Differenzierung in Osteoblasten

Unter dem Einfluss von Dexamethason, Ascorbinsäure und β -Glycerolphosphat im Kulturmedium nahm das Zytoplasmavolumen und somit die Größe der MSC im Verlauf von zwei Wochen deutlich ab. Zum Zeitpunkt der Auswertung war der Zellkern sphärisch und groß. Die Zellen schieden Calciumsalze in den Extrazellulärraum aus, die als

Calciumablagerungen am Boden der Wellplatten durch von-Kossa-Färbung nachgewiesen wurden (siehe Abb. 3.3).

3.2.3 Differenzierung in Chondrozyten

Nachdem MSC in Form eines Zellpellets für 16 Tage unter Einwirkung von Dexamethason, Ascorbinsäure, Natriumpyruvat, *transforming growth factor- β 1* (TGF- β 1) und ITS-Premix (Insulin, Transferrin, Selen) kultiviert wurden, bildete sich um die Zellen eine dicke Schicht aus Interzellulärsubstanz, die Einzelzellen voneinander trennte. Morphologisch präsentierten sich die differenzierten MSC als kleine, kugelförmige Zellen mit einem rundlichen Zellkern. In der extrazellulären Matrix wurden Glucosaminoglykane, welche charakteristisch für die Knorpelzusammensetzung sind, durch Alcian-Blue-Färbung identifiziert (siehe Abb. 3.3).

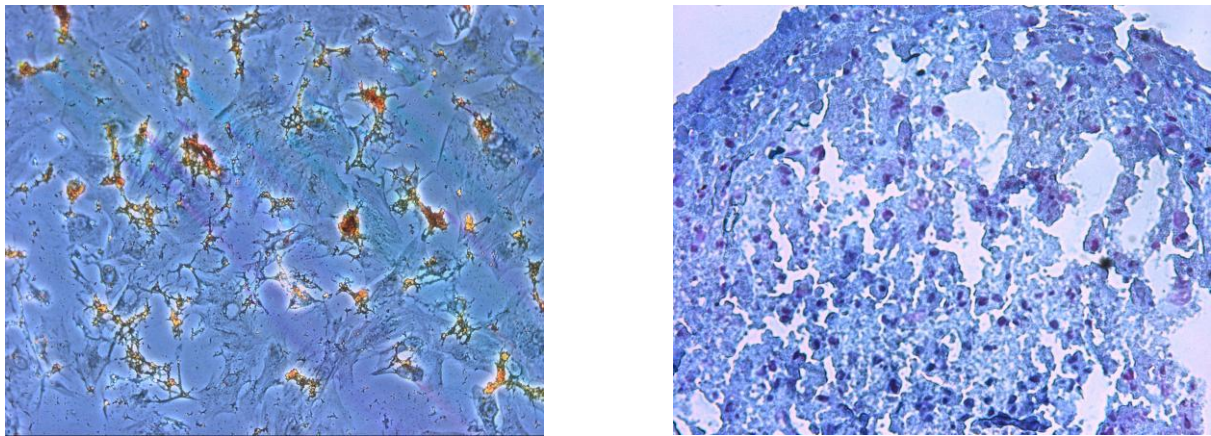


Abbildung 3-3 Differenzierung von MSC in Osteoblasten (links; 200x Vergr.; von-Kossa-Färbung) und Chondrozyten (rechts; 200x Vergr.; Alcian-Blue-Färbung).

3.2.4 Zusammenfassung

Die aus dem Knochenmark entnommenen plastikadhärenten Zellen konnten in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenziert werden. Sie erfüllten somit die Kriterien, die für die Definition mesenchymaler Stammzellen anerkannt sind⁸⁵ und konnten für die folgenden Experimente eingesetzt werden.

3.3 Immunphänotypisierung von MSC und Hepatozyten

Im Durchflusszytometer wurden Einzelzellsuspensionen von sowohl kultivierten mesenchymalen Stammzellen wie auch von durch Leberperfusion gewonnenen Hepatozyten von F344-Ratten phänotypisiert.

Mesenchymale Stammzellen färbten positiv für MHC Klasse I (RT1A^{haplotyp^l}) und CD80, ohne jedoch MHC Klasse II (RT1B) oder das kostimulatorische Molekül CD86 zu exprimieren. CD90 (Thy1) und CD73 wurden als weitere Oberflächenmarker identifiziert. MSC färbten hingegen negativ für CD4, CD25, CD26, CD45, CD49b und CK18.

Hepatozyten, welche als Kontrollzellen verwendet wurden, exprimierten MHC Klasse I (RT1A^l), CD73 und waren im Gegensatz zu den MSC positiv für CD26 und CK18. Sie waren negativ sowohl für MHC Klasse II (RT1B), die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 als auch für CD3, CD4, CD25, CD45 und CD90 (Thy1).

| | MHC I | MHC II | CD80 | CD86 | CD 90 | CD73 | CD26 | CK18 | CD3 | CD4 | CD25 | CD45 | CD49b |
|-------------|-------|--------|------|------|-------|------|------|------|-----|-----|------|------|-------|
| MSC | + | - | (+) | - | + | + | - | - | | - | - | - | - |
| Hepatozyten | + | - | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | |

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der Phänotypisierung von MSC und Hepatozyten.

Der Oberflächenphänotyp der MSC entsprach den bereits in der wissenschaftlichen Literatur beschriebenen Angaben⁸⁵. Die Zellpopulation war nicht mit hämatopoetischen Stammzellen oder Zellen des Immunsystems verunreinigt. Hepatozyten exprimierten typische Marker für Zellen des Endoderms und zeigten ebenfalls keinerlei Kontamination durch zelluläre Blutbestandteile.

3.4 Zelldistribution

Das Ziel dieser Versuche war es, die Verteilung injizierter MSC im Lebergewebe zu bestimmten Zeitpunkten nach Applikation zu untersuchen. Es sollte geklärt werden, in welchen Bereichen des Parenchyms sich transplantierte Zellen vorwiegend einfügen, wie sich ihre Zellzahl im zeitlichen Verlauf ändert, und welchen Einfluss toxische Leberschädigung auf das Distributionsverhalten von MSC hat. Hierfür sind MSC mit zwei verschiedenen Methoden markiert und danach appliziert worden.

3.4.1 Distribution BrdU-markierter MSC

Um die mesenchymalen Stammzellen in der Leber zu verschiedenen Zeitpunkten lokalisieren zu können, wurden MSC mit 5-bromo-2-desoxyuridine (BrdU) markiert und Versuchstieren intraportal injiziert. Diese wurden in Abhängigkeit von dem angewandten Protokoll mit oder ohne AA behandelt. Jeweils drei Ratten wurden nach zwei Stunden, zwei Tagen und sieben Tagen nach Zelltransplantation getötet. Anschließend wurden pro Tier sechs verschiedene Schnitte eines Leberlappens immunhistochemisch untersucht (siehe Abb. 3.4).

In der Versuchsgruppe ohne AA-Applikation betrug die mittlere Zellzahl pro Schnitt nach zwei Stunden 173 Zellen. Einzelne positivgefärbte Zellen waren zum großen Teil periportal lokalisiert. Im gesamten Leberparenchym befanden sich jedoch neben Einzelzellen auch Zellaggregate (3-5 Zellen). Nach zwei Tagen sank die Zellzahl jedoch erheblich, auf im Mittel 7.5 Zellen pro Schnitt. Sieben Tage nach Transplantation konnten nur 6.2 Zellen pro Schnitt in der Leber wieder gefunden werden (siehe Abb. 3.4). MSC, die sich innerhalb des Gefäßsystems befanden, welches an einigen Stellen Thromben aufwies, wurden nicht mitgezählt, da diese sich offensichtlich nicht in das Organparenchym integriert hatten.

In den Versuchstieren, die mit AA behandelt wurden, waren nach zwei Stunden im Mittel 152.7 Zellen pro Schnitt zu finden. Nach zwei Tagen wurden wiederum nur 7.3 MSC pro Schnitt gezählt. Einzelzellen und Zellgruppen waren auffällig häufig in der Nähe von Gewebsektosen lokalisiert (siehe Abb. 3.6). Am siebten Tag sank die mittlere Zellzahl auf 3.75 Zellen. Darüber hinaus wurden bei einem einzelnen Tier, das nach dem gleichen Protokoll behandelt, aber erst nach 30 Tagen getötet wurde, in einigen Schnitten wenige Einzelzellen gefunden.

Im Vergleich zu der Versuchsgruppe ohne AA-Injektion war nach zwei und sieben Tagen kein signifikanter Unterschied in der Zahl der MSC zu beobachten (t-Test: $p = 0,32$). Aus diesem Grund wurde bei den korrespondierenden Distributionsversuchen mit GFP-transfizierten MSC auf eine Leberschädigung verzichtet.

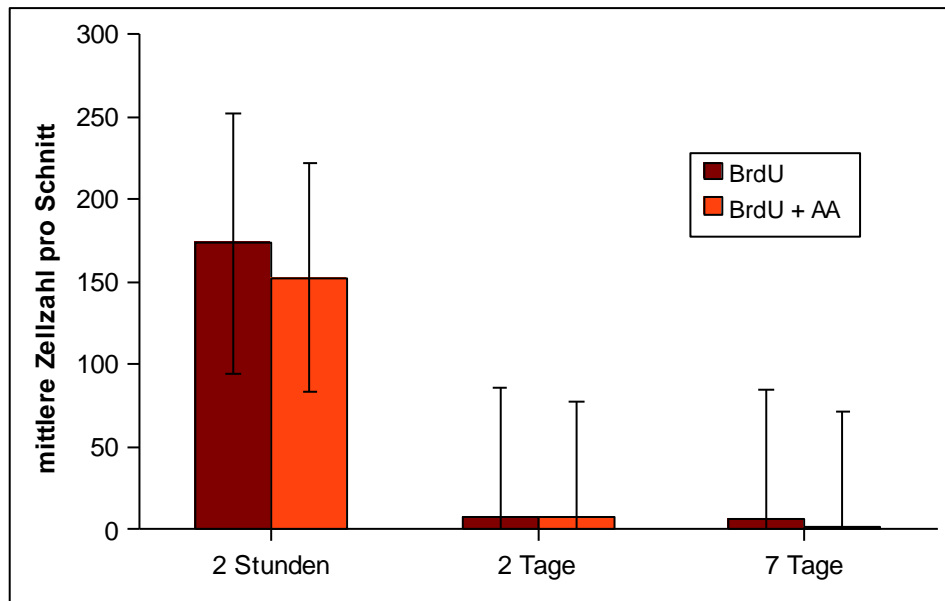


Abbildung 3-4 Distribution BrdU-markierter MSC mit und ohne Leberschädigung durch AA nach 2 Stunden, 2 Tagen und 7 Tagen.

3.4.2 Distribution GFP-transfizierter MSC

Zur Bestätigung der Ergebnisse der BrdU-Färbung wurden im gleichen Modell Distributionsversuche mit GFP-transfizierten MSC durchgeführt.

Nach erfolgter Zellapplikation wurden jeweils zwei Tiere nach zwei Stunden, zwei Tagen und sieben Tagen untersucht. Hierfür sind zwischen fünf und zwölf unterschiedliche Gewebeschnitte eines oder mehrerer Leberlappen fluoreszenzmikroskopisch analysiert und die mittlere Zellzahl bestimmt worden (siehe Abb. 3.6). Nach zwei Stunden betrug die Zellzahl im Mittel 339 Zellen pro Schnitt. Einzelzellen oder Zellgruppen (3-8 Zellen) waren über das gesamte Leberparenchym verteilt und zunächst in der Nähe von Periportalfeldern lokalisiert. Am zweiten Tag nach Transplantation sank die Zahl der MSC drastisch auf 1.4 Zellen pro Schnitt. Nach sieben Tagen konnten keine positiven Zellen mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.5). MSC, die sich intravasal oder innerhalb von Thromben befanden, wurden nicht mitgezählt.

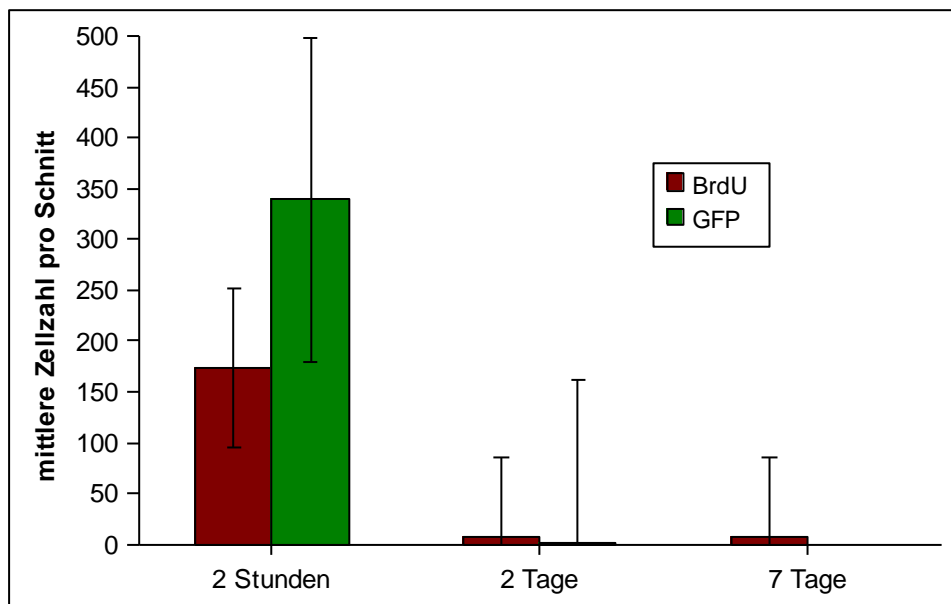


Abbildung 3-5 Distribution BrdU- und GFP-markierter MSC ohne Leberschädigung nach 2 Stunden, 2 Tagen und 7 Tagen.

3.4.3 Zusammenfassung

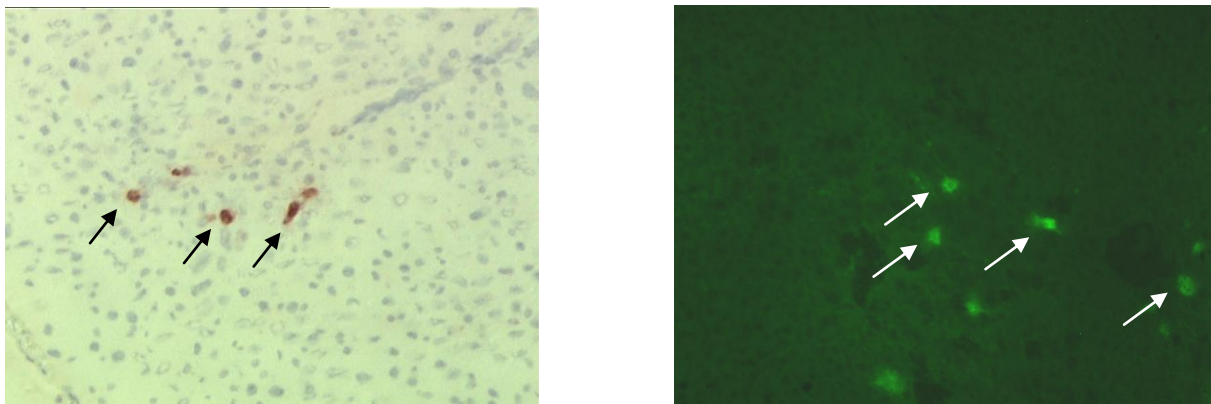


Abbildung 3-6 Distribution von MSC: BrdU-immunohistochemische Färbung (links; 200x Vergr.; schwarze Pfeile) und GFP-Fluoreszenzmikroskopie (rechts; 100x Vergr.; weiße Pfeile).

Sowohl die Auszählung der BrdU-gefärbten, als auch der GFP-exprimierenden MSC ergab, dass direkt nach Zellapplikation eine hohe Zahl an mesenchymalen Stammzellen das Leberparenchym infiltrierten. Schon zwei Tage nach Transplantation sank die Zahl der gefundenen MSC rapide. Im GFP-Protokoll erfolgte der Abfall der Zellzahl schneller als mit BrdU-Zellen. Nach sieben Tagen waren einzelne BrdU-gefärbte MSC noch auffindbar, wohingegen zum gleichen Zeitpunkt keine GFP-Fluoreszenz mehr nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.7).

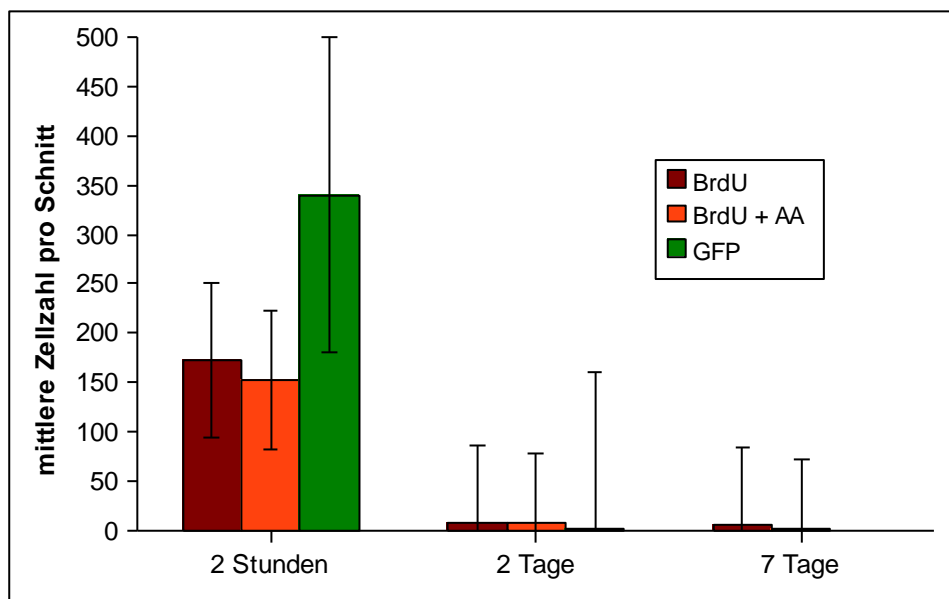


Abbildung 3-7 Vergleich der Distribution zwischen BrdU- und GFP-markierten MSC mit und ohne Leberschädigung durch AA nach 2 Stunden, 2 Tagen und 7 Tagen.

3.5 Applikation von Hepatozyten bei subakutem Leberversagen

Im Vorfeld der Experimente, in denen mesenchymale Stammzellen zur Anwendung kamen, wurde die Ansiedlungsdynamik von Hepatozyten nach intraportaler und intrahepatischer Transplantation im DPPIV-/-Tiermodell untersucht. Die Versuchstiere wurden unterschiedlichen hepatotoxischen Stimuli ausgesetzt, was ein abweichendes Integrations- und Wachstumsverhalten der applizierten Zellen zur Folge hatte.

3.5.1 Behandlung mit Retrorsine ohne zusätzliche Leberschädigung

Hepatozyten von F344-Ratten, die das Oberflächenantigen CD26 exprimierten, wurden intraportal in CD26-negative Empfängertiere, die nur mit Retrorsine zweimal vorbehandelt wurden (n=6), injiziert. Nach 30 Tagen ergab die histologische Analyse der Gewebeschnitte ein gleichmäßiges Anwachsen und Proliferation der transplantierten Leberzellen im gesamten Leberparenchym. Die beobachteten Zellcluster waren mit durchschnittlich zwei bis vier Spenderzellen im Durchmesser relativ klein. Darüber hinaus zeigte die HE-Färbung eine diffuse Megalozytose der Empfängerhepatozyten, bei sonst normaler Leberstruktur. Es waren keine akuten oder chronischen Entzündungszeichen zu finden (siehe Abb. 3.8).

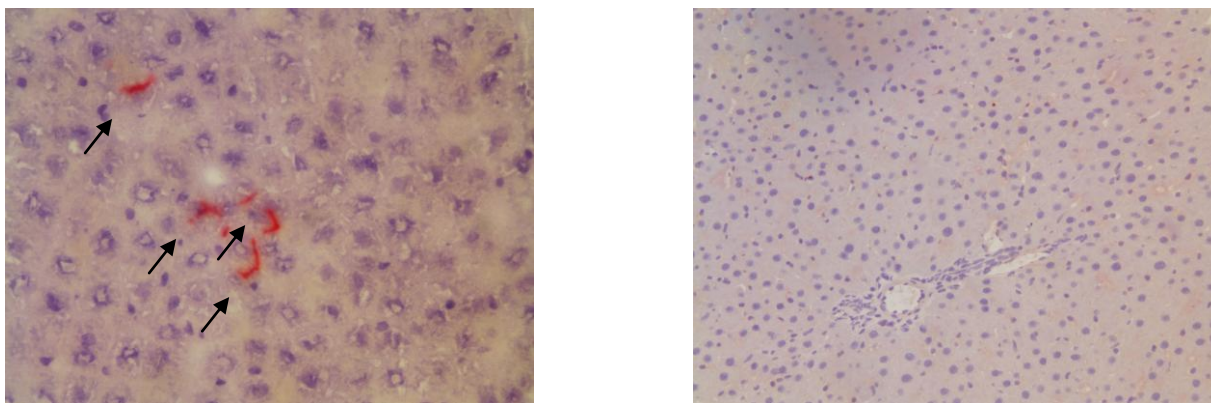


Abbildung 3-8 DPPIV-Enzymhistochemische Färbung nach Hepatozytentransplantation;
links: nur Retrorsine-Behandlung (400x Vergr., vier positive Zellen; schwarze Pfeile); rechts: nur CCl₄-
Behandlung (100x Vergr., keine positiven Zellen).

3.5.2 Leberschädigung mit CCl₄

Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss eine toxische Leberschädigung auf die Ansiedlungsrate der Spenderhepatozyten hat. Zunächst wurde DPPIV-/- Ratten zweimalig im Abstand von zwei Wochen nach intraportaler Zelltransplantation nur CCl₄ verabreicht (n=3). Bei diesem Ansatz konnten nach 60 Tagen keine CD26-positiven Zellen in den Empfängerlebern nachgewiesen werden. Histologisch wies das Leberparenchym einzelne Entzündungszellen auf (siehe Abb. 3.8).

3.5.3 Leberschädigung mit AA

Wurde jedoch ausschließlich AA, das nach durchgeführter Zelltherapie kontinuierlich alle drei Tage verabreicht wurde, als lebertoxisches Agens verwendet, konnten wenige CD26-positive Hepatozyten beobachtet werden. Bei Applikation der Zellen in die *V. portae* waren nach 30 Tagen (n=2) und 60 Tagen (n=1) meist kleinere Zellgruppen (2 Zellen) im Leberparenchym gleichmäßig verteilt. Interessanterweise lieferte die direkte Injektion CD26-positiver Hepatozyten in die Leber (n=3) ein ähnliches Ergebnis nach 30 Tagen. Kleinere Zellcluster von zwei bis sechs Zellen im Durchmesser waren in der gesamten Leber zu sehen. An der Applikationsstelle war jedoch entweder keine oder nur geringe Spenderzellansiedlung zu beobachten (siehe Abb. 3.9). Das Leberparenchym der Empfängertiere wies eine vermehrte Infiltration von Lymphozyten und beginnenden fibrotischen Umbau des Gewebes auf.

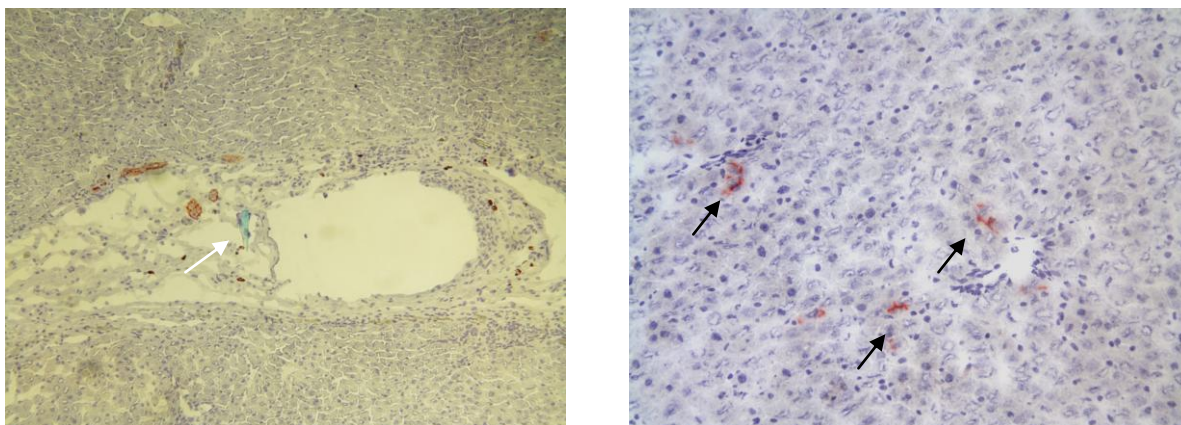


Abbildung 3-9 Immunhistochemische Färbung CD26-positiver Hepatozyten;

links: nur AA-Behandlung mit intrahepatischer Zellapplikation (40x Vergr., kleine positive Zellcluster an der Einstichstelle mit Restfaden, weißer Pfeil); rechts: nur AA-Behandlung mit intraportaler Zellapplikation (100x Vergr., kleine positive Zellcluster; schwarze Pfeile).

3.5.4 Leberschädigung mit CCl₄ oder AA in Verbindung mit Retrorsine

In weiteren Versuchsansätzen wurde auf eine Kombination aus Leberschädigung und -regenerationsblockade mit Retrorsine zurückgegriffen. Bei den Tieren, denen CCl₄ intraportal verabreicht worden war, konnten nach 30 Tagen im gesamten Lebergewebe verteilte Zellcluster mit der Größe von drei bis 18 positiven Zellen beobachtet werden (n=4). Ähnliche Ergebnisse wurden bei gleicher Versuchsdauer durch den Einsatz von AA als hepatotoxisches Agens erzielt. Diese unterschieden sich unwesentlich in Abhängigkeit vom Injektionsort der Spenderhepatozyten voneinander. Wurde der Zellapplikationsweg über die Portalvene (n=3) gewählt, so waren Zellansammlungen mit vier bis 21 Zellen überall im Parenchym zu finden. Bei direkter Injektion der Hepatozyten ins Lebergewebe (n=3) wurden Zellgruppen von zwei bis 11 positiven Zellen nachgewiesen. In einem Versuchstier war die Lokalisation der Cluster nur auf die Region um die Injektionsstelle beschränkt, ansonsten waren die Spenderzellen gleichmäßig im Leberparenchym verteilt. Histologisch zeigten die Schnitte, außer der für die Behandlung mit Retrorsine typischen Megalozytose der Empfängerhepatozyten, vor allem in mit AA behandelten Tieren auch Zeichen von Fibrose und einer chronischen Entzündung (siehe Abb. 3.10).

3.5.5 Zusammenfassung

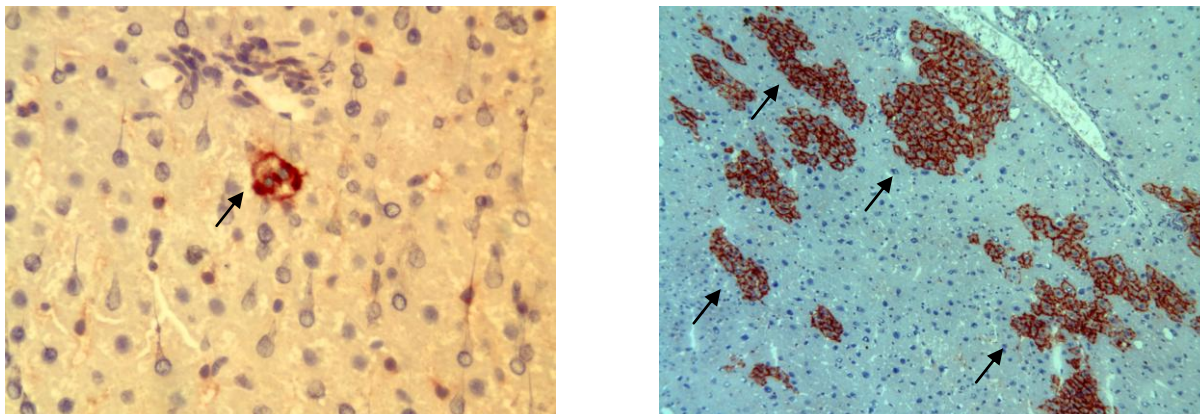


Abbildung 3-10 Immunhistochemische Färbung CD26-positiver Hepatozyten;
links: nur AA-Behandlung (400x Vergr., zwei positive Zellen); rechts: Kombinationsbehandlung mit AA
und Retrorsine (100x Vergr., große positive Zellcluster).

In den oben beschriebenen Versuchen zeigte sich, dass die Transplantation DPPIV-positiver Hepatozyten in CD26-negative Empfängertiere, die eine Kombinationsbehandlung mit Retrorsine und AA oder CCl_4 zur Leberschädigung erhalten haben, zu einer stabilen und umfangreichen Spenderzellansiedlung in der Leber führte. Das durch gleichzeitige Mitoseinhibition und toxischen Schaden an den Empfängerhepatozyten bedingte Milieu war für die Zellansiedlungsdynamik den übrigen Schädigungsprotokollen überlegen. Im Gegensatz zur Anwendung von CCl_4 war es möglich nach alleiniger multiplen Applikation von AA eine Population CD26-positiver Zellen im Leberparenchym der Empfänger zu etablieren. Dies war auch bei alleiniger Gabe von Retrorsine möglich. Die Spenderhepatozyten waren in fast allen Fällen gleichmäßig über das gesamte Lebergewebe verteilt. Interessanterweise schien der gewählte Zelltransplantationsweg kaum Einfluss auf das Anwachsen DPPIV-positiver Hepatozyten zu haben.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 3.2.

| Tierzahl <i>n</i> | maximale CD26-positive Zellakkumulation | Applikations- stelle | Retrorsine | Leber- schädigung | Versuchs- dauer |
|------------------------------|--|---------------------------------|-------------------|------------------------------|----------------------------|
| 6 | Zellcluster (2-4) | <i>V. portae</i> | ja | -- | 30 d |
| 3 | 0 | <i>V. portae</i> | nein | CCl ₄ | 60 d |
| 4 | Zellcluster (3-18) | <i>V. portae</i> | ja | CCl ₄ | 60 d |
| 3 | Zellcluster (4-21) | <i>V. portae</i> | ja | AA | 30 d |
| 3 | Zellcluster (2-11) | Leber | ja | AA | 30 d |
| 2 | Zellcluster (2) | <i>V. portae</i> | nein | AA | 30 d |
| 1 | Zellcluster (2) | <i>V. portae</i> | nein | AA | 60 d |
| 3 | Zellcluster (2-6) | Leber | nein | AA | 30 d |

Tabelle 3-2 Zusammenfassung der Versuchsgruppen mit Transplantation von Hepatozyten.

3.6 Applikation von MSC bei subakutem Leberversagen

Nachdem ein stabiles Modell zur Transplantation von Hepatozyten unter hepatotoxischen Bedingungen etabliert wurde, wurden auch kultivierte F344-MSC in entsprechend vorbehandelte DPPIV-defiziente Ratten injiziert. Das Ziel dieser Experimente war es herauszufinden, ob die MSC in diesem Modell durch regenerative Stimuli den Phänotyp von Hepatozyten annehmen können. Die Schädigungsprotokolle wurden analog zu Vorversuchen angewandt.

3.6.1 Behandlung mit Retrorsine ohne zusätzliche Leberschädigung

In der ersten Versuchsgruppe wurde ausschließlich eine Leberregenerationsblockade mit Retrorsine ohne einen gleichzeitigen toxischen Leberschaden bei den Empfängertieren induziert und Spender-MSC intraportal transplantiert (n=6). Nach 60 Tagen waren keine DPPIV-positiven Zellen zu detektieren.

3.6.2 Leberschädigung mit CCl₄ in Verbindung mit Retrorsine

Eine hepatotoxische Vorbehandlung der Versuchstiere mit CCl₄ in Kombination mit Retrorsine bei Applikation der MSC in die Pfortader führte nach 60 Tagen (n=5) ebenfalls zu keinem Zellwachstum.

3.6.3 Leberschädigung mit AA in Verbindung mit Retrorsine

In den Kontrollgruppen mit Hepatozyten wurde im Vorfeld gezeigt, dass eine Mitoinhibition der Empfängerhepatozyten mit Retrorsine in Kombination mit AA den Spenderzellen die besten Voraussetzungen für das Anwachsen und die Proliferation lieferten. Doch durch den Wechsel des lebertoxischen Agens auf AA zur Kombinationsbehandlung mit Retrorsine bei intraportaler MSC-Transplantation konnten nach 30 Tagen (n=3) ebenso keine vom Spender stammenden Zellen nachgewiesen werden.

3.6.4 Leberschädigung mit AA ohne Retrorsine

Entsprechend färbten sich nach alleiniger Gabe von AA zur Leberschädigung ohne die Mitoinhibition der Empfängerhepatozyten nach 30 Tagen (n=7) und auch nach 60 Tagen (n=3) keine CD26-exprimierenden Zellen an.

In den Versuchsgruppen, in denen F344-MSC direkt in einen Leberlappen injiziert wurden und ein toxischer Leberschaden mit AA verursacht wurde, sind nach 14 Tagen (n=2), 30 Tagen (n=9) und 60 Tagen (n=3) ebenfalls keine Spenderzellen beobachtet worden.

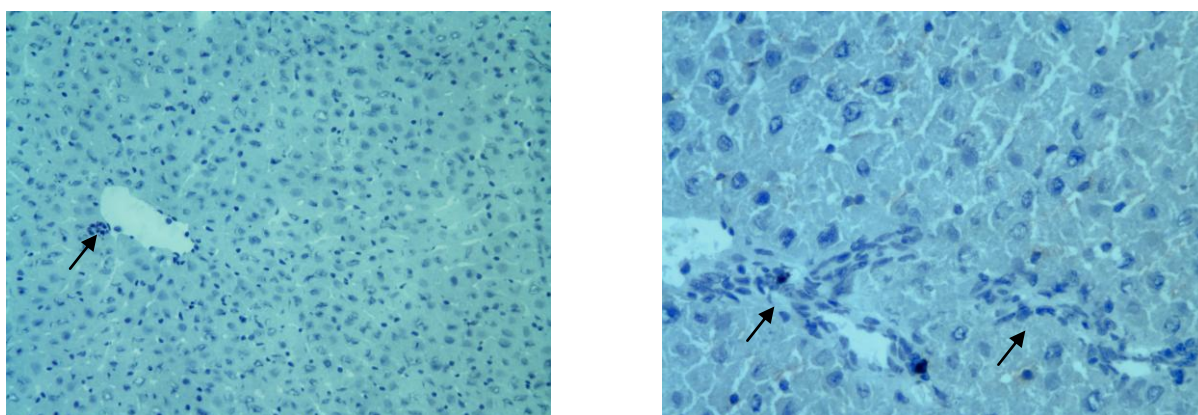


Abbildung 3-11 Immunhistochemische Färbung auf CD26 nach MSC-Injektion;

links: nur AA-Behandlung (100x Vergr., keine positiven Zellen; vereinzelt lymphozytäre Infiltration; schwarze Pfeile); rechts: Kombinationsbehandlung mit AA und Retrorsine (400x Vergr., keine positiven Zellen; vereinzelt lymphozytäre Infiltration mit fibrotischem Umbau; schwarze Pfeile).

3.6.5 *in vitro*-Stimulation von MSC und Leberschädigung durch AA mit/ohne Retrorsine

In einem letzten experimentellen Ansatz wurden MSC von Fischer-Ratten in einem speziellen Medium, das den Wachstumsfaktor hEGF, Hydrocortison, Insulin, Transferrin und Ascorbinsäure enthielt, kultiviert und für die intraportale Zellapplikation verwendet. Aber sowohl in DPPIV-negativen Empfängern, die nur mit AA vorbehandelt worden sind (n=2), als auch in Tieren, die eine Kombinationsbehandlung mit AA und Retrorsine erhalten haben (n=3), konnten nach 30 Tagen keine CD26-positiven Zellen nachgewiesen werden. Somit ist davon auszugehen, dass in diesem Versuchsansatz kein stimulierender Effekt auf MSC *in vitro* vor Transplantation erfolgte.

3.6.6 Zusammenfassung

In keiner der Versuchsgruppen, in denen F344-MSC in DPPIV-defiziente Empfänger transplantiert wurden, konnten vom Spender stammende CD26-exprimierende Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu F344-Hepatozyten, die sich in dem durch den Leberschaden induzierten Milieu im hepatischen Parenchym ansiedelten und proliferierten, waren kultivierte MSC nicht in der Lage, sich unter diesen regenerativen Bedingungen in DPPIV-positive Leberzellen zu differenzieren. Um die Wahrscheinlichkeit zu minimieren, ein positives Ergebnis zu übersehen, wurden verschiedene Leberlappen von jedem Empfängertier mit höchster Sorgfalt CD26-immunhistochemisch sowie DPPIV-histochemisch untersucht, wobei zum Teil mehr als 50 Gewebeschnitte je Lappen analysiert worden sind.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in Tabelle 3.3.

| Tierzahl <i>n</i> | maximale CD26-positive Zellakkumulation | Applikations- stelle | Retrorsine | Leber- schädigung | Versuchs- dauer |
|------------------------------|--|---------------------------------|-------------------|------------------------------|----------------------------|
| 6 | MSC (0) | <i>V. portae</i> | ja | -- | 60 d |
| 5 | MSC (0) | <i>V. portae</i> | ja | CCl ₄ | 60 d |
| 3 | MSC (0) | <i>V. portae</i> | ja | AA | 30 d |
| 7 | MSC (0) | <i>V. portae</i> | nein | AA | 30 d |
| 3 | MSC (0) | <i>V. portae</i> | nein | AA | 60 d |
| 2 | MSC (0) | Leber | nein | AA | 14 d |
| 9 | MSC (0) | Leber | nein | AA | 30 d |
| 3 | MSC (0) | Leber | nein | AA | 60 d |
| 3 | <i>stimulierte MSC (0)</i> | <i>V. portae</i> | ja | AA | 30 d |
| 2 | <i>stimulierte MSC (0)</i> | <i>V. portae</i> | nein | AA | 30 d |

Tabelle 3-3 Zusammenfassung der Versuchsgruppen mit Transplantation von MSC.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Beitrag von mesenchymalen Stammzellen (MSC) an der Leberregeneration im Vergleich zu Hepatozyten *in vivo* untersucht. Hierfür wurde ein syngenes Rattenmodell mit kontinuierlicher toxischer Leberschädigung entwickelt, in dem beide Zellarten transplantiert und immunhistochemisch durch einen speziellen Marker, das Enzym Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV), als Spenderleberzellen identifiziert werden konnten. Die Wahl von DPPIV als Marker sollte es ermöglichen, sowohl transdifferenzierte als auch mit Hepatozyten fusionierte MSC zu detektieren.

4.1 *In vitro*-Eigenschaften von MSC und Hepatozyten

Im Vorfeld der Tierversuche wurden mesenchymale Stammzellen entsprechend dem Isolationsverfahren von Pittenger et al. aus dem Knochenmark von F344-Ratten gewonnen und in Plastikflaschen kultiviert⁵⁷. In Kultur präsentierten sich die MSC als adhärente Zellen mit einer für Fibroblasten typischen Morphologie. Sie zeigten bei geringer Zelldichte die Fähigkeit zu klonalem Wachstum und bildeten aus Einzelzellen Kolonien, wofür der Fachausdruck *colony-forming unit fibroblastic* (CFU-F) verwendet wird. Dies sind Eigenschaften, die bereits Friedenstein et al. in ihren Versuchen beschrieben haben und die übereinstimmend als typisch für MSC angesehen werden^{53-55, 57, 85}. Darüber hinaus konnten die kultivierten Zellen durch spezielle *in vitro*-Behandlung in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenziert und die Ergebnisse durch entsprechende Färbemethoden gesichert werden. Die Differenzierung der MSC in diese drei mesodermalen Gewebearten unterscheidet sie von gewöhnlichen Fibroblasten, definiert ihre Multipotenz und gilt als eines ihrer Hauptcharakteristika⁸⁵. Eine Langzeitkultur von MSC war bis zur 25. Passage problemlos möglich, erwies sich aber im weiteren Verlauf wegen der mangelnden Teilungsfähigkeit und hohen Zelltodrate als nicht unbegrenzt fortführbar. Die Tatsache, dass MSC zwar ein großes Proliferationspotential haben, sich jedoch nicht uneingeschränkt erneuern können^{57, 108}, ist bekannt und lässt viele Wissenschaftler daran zweifeln, ob es sich bei den MSC in der Tat um Stammzellen oder eher um multipotente Vorläuferzellen handelt^{81, 84}. Aus diesem Grund hat sich auch die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) dazu entschieden, eine Änderung der Nomenklatur für MSC vorzunehmen⁸⁴ (siehe Kapitel 1.5). Ferner liegen in der Literatur Hinweise dafür vor, dass MSC nach langer Kultur ihr Differenzierungspotential verlieren¹⁰⁸, weshalb in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet wurde, dass für die Tierversuche Zellen bis maximal Passage 10 verwendet wurden.

Um die aus dem Knochenmark gewonnene plastikadhärente Zellpopulation näher zu charakterisieren, ist deren Immunphänotypisierung durchgeführt worden. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse ergaben eine Expression von MHC I, CD80, CD90 (Thy1) und CD73. Im Gegensatz dazu waren die Zellen negativ für die Oberflächenantigene CD4, CD25, CD45, CD49b, CD86 und MHC II. Dieser Immunophänotyp erfüllt die Kriterien, die von der ISCT als spezifisch für MSC anerkannt worden sind⁸⁵. Außerdem kann durch die Abwesenheit oben genannter Oberflächenmoleküle eine Verunreinigung der Kultur durch hämatopoetische Stammzellen und Zellen des Immunsystems ausgeschlossen werden. Weiterhin waren MSC der Passage 5 negativ für CK18. Eine Expression dieses Markers hätte entweder auf eine Kontamination mit Epithelzellen oder eine spontane Differenzierung von MSC in Richtung epithelialer Vorläuferzellen unter Kulturbedingungen hingedeutet. Letzteres ist von Aurich et al. für humane MSC beschrieben worden⁸⁷. Zudem färbten MSC negativ für das Molekül CD26, das auch als DPPIV bekannt ist. Dies war für die Etablierung des DPPIV-Rattenmodells ausschlaggebend, da nur ein Übergang von MSC in Zellen mit einem hepatischen Phänotyp eine Neuexpression von CD26 bedeutet hätte, welches normalerweise vor allem auf Epithelzellen und T-Zellen zu finden ist¹⁰⁰.

Im Gegensatz zu MSC wurden Hepatozyten nicht kultiviert, sondern direkt nach der Isolierung aus den Lebern von F344-Ratten für darauffolgende Versuche bereitgestellt. Hepatozyten lassen sich schwer in Kultur expandieren und zeigen darüber hinaus *in vitro* die Tendenz einer Umwandlung von einem epithelialen in einen mesenchymalen Zelltypus⁴². Die durchflusszytometrische Messung einer Suspension frisch gewonnener Hepatozyten zeigte negative Ergebnisse für die Expression von CD3, CD4, CD25, CD45, CD80, CD86, CD90 (Thy1) und MHC II. Somit ist davon auszugehen, dass eine Verunreinigung durch Zellen des blutbildenden Systems, Immunzellen und relevante Mengen an endogenen Leberstammzellen nicht stattgefunden hat. Des Weiteren waren Hepatozyten positiv für MHC I, CD 26, CD73 und CK18. CD26 ist, wie CK18, ein epithelialer Marker und wird von F344 Ratten ubiquitär exprimiert.

4.2 Distribution und Verbleib von MSC in der Leber

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war das Studium des Verhaltens mesenchymaler Stammzellen *in vivo* in einem Leberschädigungsmodell. In diesem Zusammenhang wurden Experimente durchgeführt, die die Distribution, Lokalisation und den Verbleib von MSC in

der Leber nach erfolgter Transplantation evaluieren sollten. Hierzu wurden MSC mit 5-bromo-2-desoxyuridine (BrdU) und GFP markiert, Versuchstieren mit und ohne toxischer Leberschädigung intraportal appliziert und zu festgelegten Zeitpunkten histologisch analysiert. Die quantitative Auswertung ergab, dass sich zwei Stunden nach Transplantation sowohl BrdU-gefärbte als auch GFP-positive MSC in großer Zahl im gesamten Lebergewebe verteilt hatten. Die Zellen wurden entweder einzeln oder als kleine Gruppen innerhalb der Leberläppchen und der Periportalfelder detektiert. An den Ergebnissen fällt auf, dass trotz gleicher Applikationszahl von MSC mit der GFP-Methode im Gegensatz zur BrdU-Färbung deutlich mehr Zellen gezählt wurden. Dies kann mehrere Ursachen haben:

Zum einen weist die Leber eine starke Autofluoreszenz auf, die für falsch-positive Zählung gesorgt haben könnte und dadurch die Zahl GFP-positiver Zellen zu hoch ausfallen ließ. Bei der Herstellung der histologischen Schnitte wurde jedoch ein spezielles Eindeckmedium benutzt, um eben diesen Effekt zu minimieren. Zum anderen kann es sein, dass nicht alle MSC in der Zellkultur BrdU aufgenommen haben und dadurch die Zahlen positiver Zellen niedriger waren als im korrespondierenden Experiment. Nach Vorversuchen zur Etablierung der BrdU-Färbung wurde allerdings das Protokoll gewählt, das sich durch die höchste Rate an angefärbten Zellen (ca. 90%) auszeichnete. Eine weitere, sehr wahrscheinliche Erklärung für den Unterschied in den Zellzahlen liegt in den beiden angewandten Markierungsmethoden. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff GFP wird vor allem im Zytoplasma exprimiert, wohingegen BrdU die DNA und somit nur den Zellkern anfärbt. Da im Falle der MSC das Volumen des Zytoplasmas das des Zellkerns deutlich übersteigt, war die Wahrscheinlichkeit höher, eine GFP-positive Zelle bei der Herstellung der Präparate anzuschneiden und diese als Spenderzelle zu werten, als umgekehrt.

Im weiteren Verlauf ist zwei Tage nach Injektion die Zahl der gefundenen MSC stark gesunken. Zu diesem Zeitpunkt konnten, im Gegensatz zu den Ergebnissen nach zwei Stunden, weniger GFP- als BrdU-markierte Zellen identifiziert werden. Nach sieben Tagen waren keine GFP-MSC mehr nachweisbar, wohingegen einzelne BrdU-gefärbte MSC noch detektiert werden konnten. Die Beobachtung, dass GFP-transfizierte Zellen am Tag 2 im Vergleich zu BrdU-MSC zahlenmäßig schneller abgesunken sind und an Tag 7 nicht mehr auffindbar waren, kann man auf die Immunogenität von GFP zurückführen¹⁰⁹. Es ist auch nicht auszuschließen, dass der Rückgang der Zellzahlen im zeitlichen Verlauf an einer verminderten GFP-Expression oder am Verlust des BrdU-Farbstoffes lag. Dieser Annahme

steht die Tatsache entgegen, dass in der Leber eines einzelnen Versuchstieres noch nach 30 Tagen BrdU-positive Zellen gefunden wurden.

Des Weiteren hatte die Applikation des hepatotoxischen Agens Allylkohol und die dadurch resultierende Schädigung des Lebergewebes zu keinem Analysezeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der verbliebenen Spenderzellen. Dies steht im Widerspruch zu bereits publizierten Daten, dass MSC durch freigesetzte Botenstoffe stimuliert werden und spezifisch an den Ort einer Gewebeschädigung migrieren^{72, 73, 110}. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass der Großteil der Zellen schon frühzeitig aus der Leber entfernt wurde, da MSC nicht die nötigen Adhäsionsmoleküle exprimierten und dadurch die endotheliale Barriere kaum überwinden konnten. In der kurzen Zeit, in der MSC intrahepatisch den Stimuli durch Zytokine ausgesetzt wurden, war eine Zellantwort auf der Ebene der Expression spezifischer Gene noch nicht möglich. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Mechanismus verzögert eingetreten ist und auf die wenigen in der Leber verbliebenen MSC Einfluss hatte. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass zwei Tage nach Zellapplikation MSC auffallend häufig in der Nähe von Gewebsnekrosen lokalisiert waren.

Die beschriebene Problematik, dass mesenchymale Stammzellen nicht langfristig an ihrem Applikationsort im geschädigten Zielorgan verbleiben, wurde nicht nur in der vorliegenden Studie aufgezeigt, sondern auch von einigen anderen Autoren berichtet^{69, 111, 112}. Iso et al. haben zwar einen therapeutischen Effekt humaner MSC in ihrem xenogenen Herzinfarktmodell gesehen, konnten jedoch nach drei Wochen keine menschlichen Zellen mehr im Herzgewebe nachweisen¹¹². Weiterhin haben Horwitz et al. während ihrer klinischen Studien bei Kindern mit *Osteogenesis imperfecta*, denen MSC transplantiert wurden, nur eine geringe Rate an Spenderzellen (1-2%) im Knochen und anderen Organen beobachten⁶⁹. Es gibt daher Hinweise dafür, dass sich nur eine geringe Anzahl an MSC im Zielgewebe ansiedelt¹¹⁰ und die verbleibende Mehrheit der Zellen entweder zum Beispiel durch Makrophagen¹¹³ eliminiert wird oder auswandert. Es besteht die Möglichkeit, dass MSC, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden, dort wieder zurück in ihre Zellenische und ihr angestammtes Milieu migrieren¹¹⁴ (siehe Kapitel 4.4.).

4.3 Beitrag von Hepatozyten und MSC an der Leberregeneration

Die Evaluierung des Beitrags von syngenesischen mesenchymalen Stammzellen an der Leberregeneration durch Transdifferenzierung oder Zellfusion war Hauptanliegen dieser Arbeit und wurde unter Einsatz verschiedener hepatotoxischer Schädigungsmodelle im Vergleich zu Hepatozyten erhoben. Das Oberflächenprotein Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) wurde als genetischer Marker genutzt, um Spenderzellen zu identifizieren, die dieses Enzym entweder, wie im Falle von Hepatozyten, von vornherein exprimierten, oder diese Fähigkeit in Folge von Zelldifferenzierung oder -fusion von MSC erlangt haben. Diese Schlussfolgerung war möglich, da MSC zwar das intakte Gen besitzen, dies jedoch inaktiviert ist, und das entsprechende Protein nicht transkribiert wird. Leberschädigung wurde in Versuchstieren mit Tetrachlorkohlenwasserstoff (CCl₄) und Allylalkohol (AA) erzielt. Beides sind Substanzen, die zwar selektiv auf die Leber wirken, sich aber im Schädigungsmuster unterscheiden⁹⁸. Zum Teil kam auch das Pflanzenalkaloid Retrorsine zum Einsatz, das gezielt die Mitose von Leberzellen inhibiert und der Hemmung der Eigenregeneration durch Empfängerhepatozyten dient. Dieser Wirkstoff wurde einzeln oder in Kombination mit AA oder CCl₄ verabreicht.

In allen Versuchsgruppen, die mit DPPIV-positiven Hepatozyten transplantiert und mit Retrorsine behandelt wurden, konnten Spenderzellen nachgewiesen werden. Wie bereits von Laconi et al. beschrieben, war eine alleinige Applikation von Retrorsine ausreichend für eine erfolgreiche Ansiedelung DPPIV-positiver Leberzellen⁹⁶. Dies erscheint zunächst verwunderlich, da keine Zeichen einer akuten Entzündung oder von Nekrosen im Leberparenchym und somit kein offensichtlicher Regenerationsstimulus festgestellt werden konnte. Histologisch auffällig war nur die Megalozytose einzelner Hepatozyten, die jedoch als Folge für eine Vergiftung mit einem Pflanzenalkaloid als typisch anzusehen ist⁹⁴. Laconi et al. haben beobachtet, dass durch die Hemmung der Zellteilung im physiologischen Zellumsatz das Organgewicht und der DNA-Gehalt der Leber nach Behandlung mit Retrorsine deutlich reduziert war⁹⁶. Die Autoren gehen davon aus, dass dieses Defizit an Lebergewebe eine Ursache dafür war, dass transplantierte Hepatozyten, die nicht der Wirkung des Alkaloids ausgesetzt waren, sich ansiedelten und proliferierten. Es ist möglich, dass das verkleinerte Organ den Anforderungen des Körpers hinsichtlich metabolischer Leberfunktionen nicht mehr nachkommen konnte und dies den Regenerationsreiz auslöste. Fausto et al. beschreiben in diesem Zusammenhang, dass neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die bei Leberschädigung ausgeschüttet werden, auch metabolische

Einflüsse, wie zum Beispiel der Serumspiegel von Aminosäuren im Blut, eine wichtige Rolle bei der Leberregeneration spielen¹¹⁵. Des Weiteren hat die mitotische Inhibition der Empfängerhepatozyten durch Retrorsine in Kombination mit AA oder CCl₄ stets zu einer höheren Zahl an proliferierenden Spenderzellen geführt, als eine Einzelbehandlung mit einem der drei Toxine.

Im Gegensatz zu AA konnten in Versuchstieren, die nur mit CCl₄ ohne Retrorsine behandelt wurden, keine Spenderhepatozyten nachgewiesen werden. Dieser Beobachtung liegen wahrscheinlich die unterschiedlichen Schädigungsmechanismen beider Substanzen zugrunde. CCl₄ wird im Leberläppchen von Leberzellen in der innersten Zone um die Zentralvene verstoffwechselt¹⁰² (siehe Feinbau der Leber S. 87). Die Entstehung von hepatotoxischen Metaboliten führt an dieser Stelle zu einer weitläufigen Nekrose des Gewebes. Ohne die mitotische Blockade intakter Hepatozyten, die sich weiter außen in der Nachbarschaft der Periportalfelder befinden, wird das nekrotische Areal innerhalb von zwei Wochen regeneriert⁹⁸. Dabei wandern Zellen aus der äußeren Zone in Richtung der Zentralvene⁹¹. Applizierte Spenderzellen haben somit keinen Selektionsvorteil gegenüber nativen Hepatozyten. Im Gegensatz dazu findet die Leberschädigung durch AA vor allem in der Außenzone der Leberläppchen und am Periportalfeld statt. Ursache hierfür ist die rasche Aufnahme von AA aus dem portalen Blutstrom durch periportale Hepatozyten und seine dadurch örtlich begrenzte Oxidation zu Acrolein, das für die hepatotoxische Wirkung verantwortlich ist¹⁰⁵. Darüber hinaus führt AA zu einer Schädigung von Endothelzellen im Periportalgebiet und zu Zirkulationsstörungen in diesem Bereich¹⁰⁴. Ohne die Mitoseinhibition durch Retrorsine teilen sich die gesunden Hepatozyten in den inneren Zonen des Leberläppchens zwar, können aber nicht zurück nach außen migrieren. Die Regeneration des geschädigten Gewebes übernehmen „*oval cells*“ aus den terminalen Gallengängen⁹⁸. Im Falle des vorliegenden Experiments waren es die transplantierten DPPIV-positiven Hepatozyten. Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich das Schädigungsmodell, in dem die Eigenregeneration der Empfängerleber durch Retrorsine gehemmt und ein Parenchymschaden durch AA verursacht wurde, als am effektivsten herausgestellt hat.

Da in Distributionsversuchen beobachtet wurde, dass Spenderzellen in kurzer Zeit größtenteils aus der Leber entfernt worden waren (s.o.), wurden Hepatozyten nicht nur über die Pfortader, sondern auch direkt in das Leberparenchym injiziert. Es konnten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Applikationswegen festgestellt werden.

DPPIV-positive Leberzellen waren auch bei intrahepatischer Transplantation im Gewebe gleichmäßig verteilt. Es ist anzunehmen, dass Hepatozyten, die direkt im Parenchym platziert worden waren, vom Blutstrom mitgenommen und in die Lebersinusoiden gespült wurden, bevor sie an der Injektionsstelle Zell-Zell-Kontakte bilden konnten. Zudem ist in allen Versuchsansätzen von einer vollständigen Integration der Hepatozyten in das Lebergewebe der Empfängertiere auszugehen. Dipeptidyl-peptidase IV wird auf Leberzellen nur apikal in den Gallenkapillaren exprimiert und eine immunhistochemische Färbung dieses Oberflächenproteins erlaubt Rückschlüsse auf die Integrität der Kapillarsysteme¹¹⁶, die in den DPPIV-positiven Zellclustern gegeben schien. Ferner haben Laconi et al. beschrieben, dass Hepatozyten, die im DPPIV-Modell transplantiert wurden, sich anatomisch, morphologisch und funktionell nicht von normalen adulten Leberzellen unterschieden⁹⁴.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Hepatozyten, wurden unter identischen Bedingungen keine transdifferenzierten mesenchymalen Stammzellen DPPIV-positiver Spendertiere im angewandten Leberschädigungsmodell nachgewiesen. Weder nach 30, noch nach 60 Tagen kontinuierlicher Schädigung durch AA oder CCl₄ mit und ohne Retrorsine konnten in 43 Versuchstieren DPPIV-positive Zellen gefunden werden.

4.4 Keine hepatische Differenzierung von MSC *in vivo* bei Leberschädigung

Demnach konnte im vorliegenden Modell keine Differenzierung von syngenesischen mesenchymalen Stammzellen in hepatozytenähnliche Zellen beobachtet werden, obwohl das induzierte Schädigungsmilieu in der Leber ausreichend für eine erfolgreiche Ansiedelung und Proliferation von transplantierten Hepatozyten war. Es hat folglich kein Übergang der MSC von einem mesenchymalen in einen epithelialen Zelltyp stattgefunden. Dieses Resultat spricht deutlich gegen die Pluripotenz und Plastizität von MSC. Die hier in den Experimenten verwendeten Zellen entsprachen in allen Kriterien den in der Literatur für MSC beschriebenen Charakteristika⁸⁵ und konnten in drei mesodermale Gewebearten differenziert werden. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Zellpopulation, die *in vivo* verwendet wurde, keine multipotenten Eigenschaften besaß. Auch das hier angewandte Schädigungsmodell wurde in Anlehnung an vielfach erprobte Leberregenerationsstudien^{98, 116} entwickelt und die Tatsache, dass die Zelltherapie mit Hepatozyten einen eindeutigen Beitrag an Regenerationsvorgängen in den Empfängerorganen hatte, zeigt die Wirksamkeit der applizierten toxischen Stimuli. Es ist bekannt, dass bei Parenchymschaden der Leber, wie er zum Beispiel durch das Toxin Tetrachlorkohlenwasserstoff verursacht wird, bestimmte

Mediatoren freigesetzt werden, die eine Replikation von Hepatozyten initiieren¹¹⁷ und auch unter speziellen Bedingungen die Differenzierung von „*oval cells*“ fördern¹¹⁸. Hierzu gehören vor allem die Zytokine Interleukin 6 und *tumor necrosis factor* (TNF), die durch die Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren die Hepatozyten in einen proliferativen Zustand versetzen¹¹⁵. Synchron werden Wachstumsfaktoren wie *hepatocyte growth factor* (HGF), *epithelial growth factor* (EGF) und *transforming growth factor α* (TGF α) von mesenchymalen und Epithelzellen ausgeschüttet, die im Zusammenspiel mit den Zytokinen die Leberzellen zunächst auf einen Eintritt in den Zellzyklus vorbereiten (so genanntes „*priming*“) und anschließend die Mitose einleiten⁹¹. In diesem äußerst komplexen System der Leberregeneration spielen viele weitere Faktoren, wie zum Beispiel *stem cell factor* (SCF) und Oncostatin M eine Rolle, welche die Wirkung der genannten Zytokine modulieren oder verstärken¹¹⁵.

Folglich war anzunehmen, dass wirklich pluripotente mesenchymale Stammzellen in diesem Milieu aus verschiedenen potenten Differenzierungs- und Proliferationsmediatoren *in vivo* an der Leberregeneration durch eine Umwandlung der Zellen in Richtung eines hepatozellulären Phänotyps teilnehmen würden. Für diese Hypothese sprachen auch Berichte aus der Literatur, dass MSC sich *in vitro* durch Stimulation mit den erwähnten Wachstumsfaktoren HGF, EGF und Oncostatin M in Zellen differenzieren ließen, die leberspezifische Eigenschaften besaßen⁶⁴. Hierbei ist auch zu erwähnen, dass HGF und Oncostatin M zusammen mit dem *fibroblast growth factor* (FGF) entscheidenden Einfluss auf die embryonale Entwicklung der Leber und Differenzierung endodermaler Vorläuferzellen zu reifen Hepatozyten haben¹¹⁹. Dies macht deutlich, dass diese Wachstumsfaktoren für die Entstehung und Reifung einer Leberzelle ausschlaggebend sind. Die hohe Expression von HGF, sowie die Anwesenheit von Oncostatin M und FGF¹¹⁸ im geschädigten adulten Lebergewebe lässt die Annahme zu, dass sich Stammzellen mit einem hepatischen Differenzierungspotential unter diesen Bedingungen in einen leberspezifischen Phänotyp umwandeln würden. Dies war für transplantierte mesenchymale Stammzellen in dieser Arbeit nicht der Fall. Dies kann entweder daran liegen, dass MSC grundsätzlich nicht in der Lage sind *in vivo* zu Hepatozyten zu differenzieren, oder wesentliche Voraussetzungen hierfür nicht gegeben waren.

Eine mögliche Erklärung ist die mangelnde Expression wichtiger Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren auf MSC, die es den Zellen erlauben würde, in der geschädigten Leber nach Applikation zu verbleiben oder rezirkulierend durch Chemotaxis entlang eines

Zytokingradienten dorthin zurückzukehren. Dem entgegen stehen Berichte, dass MSC in geschädigtes Gewebe migrieren können^{110, 120} und dieser Prozess durch Chemokine, wie Interleukin 8, gesteuert wird⁷². Es wurde darüber hinaus beschrieben, dass MSC autokrin HGF sezernieren und den korrespondierenden Rezeptor HGFR/c-met exprimieren¹²¹. HGF zeigte einen starken promigratorischen Effekt der Zellen *in vitro*, der über das c-met Signalsystem vermittelt wurde. Außerdem ist bekannt, dass MSC das Adhäsionsmolekül ALCAM (CD166) auf ihrer Oberfläche besitzen⁷⁹, das für Zellen, die an Zellmigration und -wachstum beteiligt sind, typisch ist¹²². Die hier aufgelisteten Eigenschaften von MSC sind jedoch meist *in vitro* studiert worden und lassen kaum Schlussfolgerungen zum Verhalten der Zellen im lebenden Tier zu. Zudem ist bei *in vivo*-Versuchen in Tiermodellen, in denen Gewebeschaden durch radioaktive Ganzkörperbestrahlung erzeugt wurde, die Rate der MSC, die sich in den verschiedenen Organen nachweisen ließ, äußerst gering (0.1-2.7%)¹¹⁰. Ob die transplantierten Zellen sich nun in dem geschädigten Gewebe an Regenerations-, oder eher an Entzündungs- und Remodellierungsprozessen beteiligen, ist unklar.

Ein wesentlicher Punkt, der bei der Differenzierung von Zellen weiterhin berücksichtigt werden muss, ist die Interaktion der Zellen untereinander. Embryonale Entwicklung, Regenerations- und Heilungsvorgänge erfordern nicht nur die Anwesenheit spezieller Mediatoren, sondern auch den direkten Kontakt und die Stimulation durch benachbarte Zellen, die unterschiedlicher Herkunft und Funktion sein können. Unter normalen physiologischen Bedingungen sind Stammzellen keine unabhängigen Einheiten, sondern in so genannten „Zellnischen“ organisiert. Diese Zellnischen bieten den Stammzellen das optimale Milieu, das aus einem komplexen Zusammenspiel von Wachstumsfaktoren und Zellkontakten besteht, und ermöglichen es ihnen, ihren angestammten Funktionen nachzukommen. So wird zum Beispiel die Blutbildung im Knochenmark zum einen durch Wachstumsfaktoren, wie *stem cell factor* (SCF) und *colony stimulating factors* (CSFs), und zum anderen durch Zellinteraktionen reguliert. Hämatopoetische Stammzellen, die sich in direktem Kontakt zu Stromazellen des Knochenmarks entlang der Knochenoberfläche befinden, teilen sich symmetrisch und dienen der Selbsterneuerung der Stammzellen¹¹⁴. Verlieren hingegen die Tochterzellen bei der Zellteilung den Anschluss zu diesen Bindegewebszellen, so folgt eine Proliferation und Differenzierung der HSC. Mesenchymale Stammzellen, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden, sind ein wichtiger Bestandteil dieser zellulären Wechselwirkungen. MSC differenzieren jedoch nicht selbst, sondern beteiligen sich primär an den Prozessen, die zur Aufrechterhaltung und Stimulierung der

Blutbildung nötig sind¹²³. Dadurch lassen sich einige der oben erwähnten Eigenschaften, wie die Expression von CD166, die bei vielen an der Hämatopoese beteiligten Zellen vorkommt, erklären und müssen nicht zwangsläufig mit Zellmigration assoziiert sein¹²². Ferner ist bekannt, dass eine Zellnische durch noch größtenteils unbekannte Mechanismen nicht nur in der Lage ist, die Stammzellen an ihrem Bestimmungsort zu halten, sondern auch anzulocken¹¹⁴. Dies lässt die Annahme zu, dass, wie in der vorliegenden Arbeit, heterotop transplantierte MSC, deren angestammtes Milieu das Knochenmark war, dorthin zurückgekehrt sind. Hierfür sprechen die Ergebnisse aus den Distributionsversuchen, die gezeigt haben, dass MSC einige Tage nach Applikation fast vollständig aus der Leber verschwunden sind. Auch wurde die Beobachtung, dass aus dem Knochenmark gewonnene MSC nach intravenöser Injektion häufig wieder an ihrem Ursprungsort zu finden waren, bereits in einigen Studien gemacht^{110, 120}. Es ist anzunehmen, dass die durch die Leberschädigung freigesetzten Faktoren nicht spezifisch genug gegenüber den Signalen aus dem Knochenmark waren, um MSC am Schädigungsort anzusiedeln. Vor allem aber kann der Mangel an entsprechenden Partnern für direkte zelluläre Interaktionen ausschlaggebend dafür gewesen sein, dass MSC nicht im Leberparenchym verblieben sind.

Des Weiteren könnte die Zahl intraportal transplanteder MSC, die sich primär nicht im Lebergewebe halten konnten und mit dem Blutstrom in die Lunge gelangten waren, dort durch ortsansässigen Makrophagen stark reduziert worden sein. Dies könnte eine zeitlich versetzte Migration einzelner MSC aus dem Kreislauf oder bereits aus dem Knochenmark in die geschädigte Leber deutlich erschwert haben. In diesem Zusammenhang haben Bentzon et al. die Beobachtung gemacht, dass sich MSC nach intravenöser Applikation vermehrt in Lungenkapillaren ansammelten und von dort nicht mehr weiter verteilten¹²⁴.

Um der Tatsache, dass injizierte Zellen in kurzer Zeit aus der Leber entfernt wurden, zu begegnen, wurden direkte Zelltransplantationen ins Leberparenchym durchgeführt. Die Verteilung der Spenderzellen im Gewebe zeigte allerdings, dass sich die Zellen nicht am Applikationsort angesiedelt haben, sondern gleichmäßig verteilt waren. Diese Ergebnisse widersprechen der Studie von Sato et al., die beschrieben haben, dass humane MSC, die direkt in Rattenlebern transplantiert wurden, längerfristig an der Injektionsstelle lokalisiert waren⁶⁵. Da die Versuchstiere gleichzeitig mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A behandelt wurden, ist es möglich, dass humane MSC unter dem Einfluss eines immunsuppressiven Medikaments ein unterschiedliches Expressionsmuster an

Adhäsionsmolekülen und Distributionsverhalten im Tiermodell zeigten als syngene Ratten-
MSC ohne medikamentöse Behandlung.

Die Kombination aus Immunsuppression und xenogener Zelltherapie kann auch der Grund dafür gewesen sein, warum es Sato et al. gelungen ist, im Gegensatz zu der hier vorliegenden Arbeit, *in vivo* MSC zu Leberzellen zu differenzieren. Die Differenzierungseffektivität zu humanen Leberzellen war hierbei jedoch sehr gering und lag bei maximal 0.5%⁶⁵. In einer zweiten Studie, die von einer erfolgreichen hepatischen Differenzierung humaner MSC in einem Tiermodell berichtete, scheint die Modulation der Immunantwort in den Empfängern ebenfalls eine wichtige Rolle gespielt zu haben. Chamberlain et al. haben menschliche MSC intrauterin in drei Monate alte Schafsfeten transplantiert, deren Immunsystem in diesem Entwicklungsstadium noch unreif war. Die Effizienz der Generierung hepatozytenähnlicher Zellen, die zum Teil Albumin exprimierten, lag bei bis zu 12.5% aller Leberzellen⁹⁰. Diese sehr hohe Rate an differenzierten humanen Hepatozyten kann drei Ursachen gehabt haben:

Zum einen blieb eine Antwort der noch defizienten Immunabwehr der Tierfeten auf die fremden Zellen aus, wodurch eine hohe Zahl an MSC ins Lebergewebe gelangen und verbleiben konnte, ohne eliminiert zu werden. Zum anderen befand sich die fetale Leber in der Entwicklung, wodurch diverse starke hepatische Differenzierungsstimuli über einen konstanten Zeitraum vorhanden waren. Weiterhin ist die Leber in diesem frühen Stadium das blutbildende Organ und beherbergt hämatopoetische Stammzellen und Stromazellen⁴¹, die später nur noch im Knochenmark zu finden sind. Entsprechend dem oben vorgestellten Konzept von einer Stammzellnische, fanden die in Schafsfeten transplantierten Knochenmarks-MSC in der Leber ein optimales Milieu, um sich anzusiedeln und unter dem Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren zu differenzieren. Bei der Betrachtung der Ergebnisse von Sato et al. und Chamberlain et al., darf außerdem nicht vernachlässigt werden, dass sich menschliche mesenchymale Stammzellen von MSC aus Ratten oder Mäusen *in vitro* in einigen Eigenschaften unterscheiden⁸². Dies betrifft im Speziellen die Gewinnung, das Wachstumsverhalten in Kultur und die Differenzierungsfähigkeit der Zellen¹²⁵. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass sich xenogen transplantierte MSC im Lebenden völlig anders verhalten, als in einem Modell mit einem syngenem Ansatz. Dies dürfte vor allem in einer Kombination mit einer Immunomodulation der Empfängertiere zutreffen.

In der hier präsentierten Arbeit wurde im Gegensatz zu den beiden beschriebenen Studien ein Rattenmodell mit adulten, immunkompetenten Tieren ohne Applikation immunsuppressiver Medikamente verwendet, in dem genetisch fast identische Ratten-MSCs transplantiert wurden. Die syngenesischen MSCs differenzierten jedoch in diesem Modell einer chronischen Leberschädigung nicht und hatten keinen ersichtlichen Beitrag an der Leberregeneration. Dies lässt die Annahme zu, dass mesenchymale Stammzellen in Wahrheit nicht in der Lage sind, *in vivo* keimblattübergreifend unterschiedliche Gewebearten zu generieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit Berichten überein, dass sich MSCs in Tierversuchen kaum an Regenerationsvorgängen im geschädigten Epithelgewebe beteiligen^{126, 127}. Weder in einem Mausmodell einer ischämischen Nierenschädigung¹²⁶ noch bei chemischer Verätzung der Cornea in Ratten¹²⁷ konnte eine Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in epitheliale Zellen beobachtet werden.

Die pluripotenten Eigenschaften von MSCs werden in der Literatur auch im Falle der ektodermalen Differenzierung in Neuronen angezweifelt^{128, 129}. Es gibt verlässliche Hinweise darauf, dass die Umwandlung von MSCs in Zellen mit einem neuronalen Phänotyp nicht auf Transdifferenzierung, sondern auf Brüche im Aktinzytoskelett¹³⁰ und Artefakte durch Kulturbedingungen zurückzuführen waren¹²⁸. Außerdem haben einige Studien gezeigt, dass die plastikadhärente Zellpopulation aus dem Knochenmark, die man gemeinhin als mesenchymale Stammzellen bezeichnet, funktionell sehr heterogen ist und sich aus verschiedenen Stamm- und Vorläuferzellen zusammensetzt, die ein unterschiedliches, und zum Teil auf eine Zelllinie limitiertes Differenzierungspotential haben⁸². In welchem Umfang unter diesen Stammzellen in der Tat MSCs zu finden sind, aus denen Hepatozyten hervorgehen können, bleibt jedoch noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Für eine klinische Anwendbarkeit differenzierter MSCs müssen die Zellen nicht nur hepatische Zellmarker, sondern auch die für das Überleben essentiellen Stoffwechselfunktionen besitzen. In der vorliegenden Arbeit waren MSCs jedoch nicht in der Lage, das hepatozelluläre Oberflächenantigen Dipeptidyl-peptidase IV zu exprimieren und es ist folglich kaum davon auszugehen, dass sie funktionell weiter ausgereift waren als phänotypisch. Man kann allerdings nicht ausschließen, dass der gewählte Marker DPPIV erst spät in der Leberzellentwicklung von den Zellen akquiriert wird und unreife Hepatozytenvorstufen, die im hier angewandten *in vivo*-Modell aus MSCs hervorgegangen waren, durch DPPIV-spezifische Färbungen nicht detektiert werden konnten. Eine

Neuexpression von DPPIV in der Leber nach Transplantation von Knochenmarkstammzellen in DPPIV-defiziente Ratten ist jedoch bereits von Petersen et al. beschrieben worden³³. Vor kurzem ist es auch gelungen mesenchymale Stammzellen von DPPIV-positiven Fischer 344 Ratten aus peritonealem Fettgewebe *in vitro* in Hepatozyten zu differenzieren, wobei die Zellen deutlich einen DPPIV-positiven Immunophänotyp zeigten¹³¹. Darüber hinaus haben Oh et al. berichtet, dass sich in einem Leberschädigungsmodell „*oval cells*“ im DPPIV-Modell nach Knochenmarkstransplantation nachweisen ließen, die DPPIV-positiv Hepatozyten generieren konnten⁴¹. Ob diese Zellen aus MSC oder hämatopoetischen Stammzellen hervorgegangen waren, wurde jedoch nicht untersucht. Das dabei angewandte Schädigungsprotokoll war des Weiteren speziell auf die Induktion von „*oval cells*“ ausgerichtet und unterschied sich stark von den in dieser Studie eingesetzten Methoden.

Das Fehlen der hepatischen Expression von DPPIV nach Transplantation von MSC in der vorliegenden Arbeit führte zu der Überlegung, die Zellen *in vitro* zunächst zu stimulieren und erst anschließend den Versuchstieren zu applizieren. Hierfür wurden MSC zwei Wochen lang mit EGF, Hydrocortison, Insulin, Transferrin und Ascorbinsäure behandelt. Aber auch nach dieser Vorbehandlung konnten keine DPPIV-positiven Spenderzellen gefunden werden. Aurich et al. ist es im Gegensatz hierzu gelungen in einem ähnlichen Ansatz *in vitro* hepatozytenähnliche Zellen aus MSC zu erzeugen und diese erfolgreich in Mäuse zu transplantieren⁸⁷. Der Unterschied zu dieser Studie bestand darin, dass für die Stimulation der MSC zusätzlich HGF verwendet wurde, die Zellen drei Wochen unter diesen Bedingungen kultiviert wurden und vor allem, dass im Vorfeld eine Behandlung der MSC mit 5-Azacytidin stattgefunden hat. 5-Azacytidin ist ein Wirkstoff, der durch Entfernung von Methylgruppen an der DNA der Inaktivierung von Genen entgegenwirkt¹³². Folglich haben die so behandelten MSC unter Stimulation mit HGF und EGF die für die hepatische Differenzierung erforderlichen Gene schneller und effizienter aktiviert. Weiterhin siedelten sich in dieser Studie transplantierte MSC langfristig in der Leber an und behielten *in vivo* ihre hepatischen Eigenschaften. Die unzureichende Vorbehandlung der MSC mit Wachstumsfaktoren und 5-Azacytidin, sowie die möglicherweise zu kurze Dauer der Stimulation in der Zellkultur, können die Gründe dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit auch stimulierte MSC *in vivo* nicht in Hepatozyten ausreifen.

Zuletzt sollte angesprochen werden, dass die bei der Auswertung der Versuche angewandte immunohistochemische Detektion von Spenderzellen keine sehr sensitive Methode war. Es

kann deshalb nicht vollständig ausgeräumt werden, dass in dem vorliegenden Modell eine Differenzierung von MSC in Hepatozyten zu einem sehr niedrigen Prozentsatz stattgefunden hat. Doch nach Analyse von mehr als 500 Gewebeschnitten, in dem keine DPPIV-positive Zelle nach MSC-Injektion nachweisbar war, müsste es sich um ein äußerst seltenes Ereignis gehandelt haben. Für eine klinische Anwendung hätte dies ohnehin keine Relevanz.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen nach syngener Transplantation in einem Rattenmodell, in dem durch kontinuierliche Leberschädigung ein subakutes Leberversagen induziert worden war, nicht in Leberzellen differenzieren und somit keinen Beitrag durch Beteiligung an den Stoffwechselfunktionen der erkrankten Leber leisten können.

5 Ausblick

In der hier vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen *in vivo* weder in Hepatozyten differenzieren können, noch durch Zellfusion in der Lage sind, sich an der Leberregeneration zu beteiligen. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits publizierten Daten überein, die gegen eine Pluripotenz von MSC sprechen^{126, 128}. Eine solche Erkenntnis widerspricht der Vorstellung, dass MSC aus dem Knochenmark das adulte Pendant zu embryonalen Stammzellen darstellen könnten. Doch obwohl MSC anscheinend nicht die Fähigkeit besitzen, sich unbeschränkt in beliebige Gewebearten zu differenzieren, so ist ihr Regenerationspotential durch viele Studien gesichert¹¹¹ und kann für eine mögliche zelltherapeutische Anwendung von großer Bedeutung sein. Die Leber ist hierfür ein potentiell Zielorgan. Ein vielversprechender Ansatz für eine lebergerichtete Therapie mit MSC scheint sich mit der Differenzierung und zytochemischen Vorbehandlung der Zellen *in vitro* vor Transplantation zu eröffnen. Aurich et al. haben hierfür in ihrem Mausmodell ein eindrucksvolles Beispiel erbracht⁸⁷. In einer anderen Studie von Oyagi et al. wurden MSC in Zellkultur mit HGF vorbehandelt und anschließend in Ratten, denen CCl₄ verabreicht worden war, injiziert¹³³. Die Folge war eine Wiederherstellung der Leberfunktion und Reduktion der Fibrose des Organs. Transplantierte Zellen konnten jedoch nicht nachgewiesen werden und die Autoren gehen davon aus, dass MSC durch einen anderen Mechanismus als Transdifferenzierung therapeutisch wirksam waren. In diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass MSC durch Sekretion einer Vielzahl bestimmter Mediatoren die Entzündungsreaktion im geschädigten Gewebe modulieren und die Aktivierung endogener Stammzellen fördern^{82, 111}. In Versuchen konnte das Überleben von Versuchstieren verlängert und eine Verbesserung beeinträchtigter Organfunktionen erreicht werden. Häufig spricht man hierbei von so genannten „bystander-Effekten“ der transplantierten Zellen, die für den unterstützenden Einfluss auf die Geweberegeneration verantwortlich sind. Dies erscheint einleuchtend, da die Aufrechterhaltung der Hämatopoese im Knochenmark, an der MSC einen wesentlichen Anteil haben, ebenfalls die Bildung unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Botenstoffe erfordert¹²³. Die „bystander-Effekte“ von MSC könnten therapeutisch zur Förderung von Regenerationsvorgängen in krankhaften Organen genutzt werden.

An dieser Stelle muss betont werden, dass in der vorliegenden Arbeit weder der Einfluss einer Zelltherapie mit MSC auf das Überleben der Versuchstiere, noch auf die Leberfunktion

oder zelluläre Reparatur- und Entzündungsvorgänge im Lebergewebe untersucht wurde. Schwerpunkt der Studie war es zu evaluieren, ob MSC durch Transdifferenzierung oder Zellfusion an der Leberregeneration teilnehmen können und ob daraus ein klinischer Nutzen zu ziehen ist. Die Untersuchung möglicher „bystander-Effekte“ durch Einflussnahme der MSC auf eine durch toxische Schädigung hervorgerufene Entzündungsreaktion oder endogene Reparaturvorgänge im Leberparenchym waren nicht Ziel dieser Arbeit. Aus diesem Grund kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob solche Ereignisse in dem angewandten Tiermodell stattgefunden haben.

Trotz der Zweifel an dem Differenzierungspotential von MSC bleiben diese Zellen sowohl für die regenerative Medizin als auch für die Transplantationsmedizin vielversprechend. Nicht zuletzt durch die bereits erwähnten „bystander-Effekte“ und immunmodulatorischen Fähigkeiten der MSC bieten sie eine Reihe von Optionen für eine zelltherapeutische Anwendung. MSC zeigen nicht nur *in vitro*⁷⁵, sondern auch *in vivo* immunsupprimierende Eigenschaften⁷⁷, die für die Transplantation solider Organe durchaus von Nutzen sein könnten. Des weiteren scheinen diese Zellen durch ähnliche Mechanismen einer Leberfibrose im Tiermodell entgegenzuwirken^{133, 134}. Dies beruht höchstwahrscheinlich auf einer Milderung der Entzündung im chronisch geschädigten Organ. Es gibt außerdem weitere erwähnenswerte Hinweise darauf, dass MSC nicht nur an fibrotischen Umbauprozessen beteiligt sind^{134, 135}, sondern auch auf die Entstehung und das Wachstum von Krebs Einfluss nehmen^{136, 137}. Interessanterweise scheint die Rolle, die die MSC bei diesen Vorgängen spielen, nicht immer positive Auswirkungen zu haben^{135, 137}.

Aussichtsreiche Ansätze in der adulten Stammzellforschung ergeben sich jedoch nicht nur allein durch die Studien an MSC. Einige Arbeiten weisen darauf hin, dass die Transplantation des gesamten Knochenmarks enormes regeneratives Potential für die Leber als Zielorgan bergen könnte. Der Vorteil einer Knochenmarkstransplantation besteht darin, dass dieses Verfahren in der Klinik bereits für die Behandlung von Leukämiepatienten als Standardmethode etabliert ist und damit viel Erfahrung auf diesem Gebiet vorausgesetzt werden kann. Im Moment gibt es jedoch noch sehr viele offene Fragen, die beantwortet werden müssen, bevor diese Therapie bei Menschen mit schweren Lebererkrankungen eingesetzt werden kann. In Tierversuchen wurden allerdings schon erstaunliche Ergebnisse erzielt. Oh et al. haben in einer überzeugenden Studie gezeigt, dass das Knochenmark unter bestimmten Bedingungen in der Tat der Ursprung von leberregenerierenden Zellen sein

kann⁴¹. Weiterhin ist bekannt, dass Knochenmarkzellen vor allem durch Zellfusion für die Regeneration des geschädigten Lebergewebes mit einem klaren Überlebensvorteil der Empfänger sorgen können^{46, 51}. Bis vor kurzem wurde dies jedoch nur in einem syngenem Transplantationsmodell gezeigt. Neueste Daten belegen aber, dass Knochenmarkzellen nicht nur mit genetisch identischen Leberzellen fusionieren können, sondern dieser Vorgang auch mit allogenen Hepatozyten möglich ist. Dies bedeutet einen äußerst wichtigen Schritt für neue zelltherapeutische Ansätze in der Zukunft.

Auch sollte das Differenzierungspotential adulter Stammzellen aus dem Knochenmark nicht als artifizielles *in vitro*-Phänomen, das durch den Einfluss von speziellen Kulturbedingungen verursacht wurde, abgetan werden. Neue Isolierungsverfahren könnten dabei helfen, einzelne Zellpopulationen zu identifizieren, zu spezifizieren und anschließend ihren Fähigkeiten entsprechend zu untersuchen⁸⁵. Adulte Stammzellen, und speziell MSC, sind heterogene Populationen, die sich nach heutigem Wissensstand als solche *in vivo* nicht oder nur schwer in Zellen anderer Keimblätter differenzieren lassen. Sollte es gelingen, spezifisch Zellen gewinnen und anreichern zu können, die bestimmte Fähigkeiten mehr als andere exprimieren, wäre das für eine mögliche therapeutische Anwendung von großer Bedeutung. Bemühungen in diese Richtung wurden bereits unternommen. Vor kurzem wurde von der Entdeckung einer adulten Stammzellenpopulation im Knochenmark berichtet, die auf genetischer Ebene und in ihrem Differenzierungsverhalten embryonalen Stammzellen ähnelte¹³⁸. Für die Isolierung dieser Zellen wurden vor allem genetische und morphologische Marker gewählt. In wie weit diese Stammzellen sich physiologisch am Zellumsatz im Knochenmark und im gesamten Körper beteiligen, muss allerdings noch evaluiert werden.

All diese Punkte machen adulte Stammzellen aus dem Knochenmark für die biomedizinische Forschung zu äußerst faszinierenden und hoffnungsvollen Kandidaten für neue therapeutische Ansätze zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten, die nach heutigem Stand der Medizin nur schwer oder in vielen Fällen nicht kurativ behandelt werden können. Speziell für die Behandlung terminaler Lebererkrankungen könnte angesichts des Mangels von Spenderorganen für eine Transplantation und der mit diesem Eingriff verbundenen Nebenwirkungen eine Zelltherapie, die die lebenswichtige Stoffwechselfunktion der Leber unterstützen oder sogar übernehmen könnte, segensreich sein. Allerdings ist die Forschung auf dem Gebiet der Organregeneration mit Stammzellen noch weit von diesem ehrgeizigen Ziel entfernt, und es bedarf noch vieler wissenschaftlicher Anstrengungen, um schwerkranke

Patienten mit Leberversagen auf diese Weise erfolgreich zu therapieren. Das Beispiel der vorliegenden Arbeit, die sich mit MSC aus dem Knochenmark beschäftigt hat und keinen Beitrag dieser Zellen bei der Leberregeneration nachweisen konnte, zeigt, dass dies keinesfalls einfach sein wird. Eine Vielzahl an Fragen bezüglich adulter Stammzellen, ihrer Zellnische und *in vivo*-Eigenschaften sind noch ungeklärt und müssen durch viele weitere Studien untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich im Allgemeinen mit der Fragestellung, welchen Stellenwert adulte Stammzellen als zukünftige alternative oder unterstützende Therapie zur Lebertransplantation von Patienten mit terminalen Lebererkrankungen haben könnten. Denn trotz der enormen Eigenregenerationskraft der Leber bietet bei Versagen ihrer lebenswichtigen Funktionen nur der operative Ersatz des defekten Organs eine Chance auf Heilung. Da eine Lebertransplantation jedoch viele Komplikationen und unerwünschte Nebenwirkungen mit sich bringen kann, und der Mangel an Spenderorganen dieser Therapieform definitiv Grenzen setzt, sind alternative Behandlungsmethoden dringend erforderlich. Die Möglichkeit Hepatozyten oder Stammzellen als Zelltherapie zur Regeneration des Leberparenchyms und seiner Funktion einzusetzen, erscheint durchführbar und aussichtsreich^{21, 83}. Es wurde vielfach berichtet, dass sich adulte Stammzellen in eine Vielzahl reifer Gewebe^{30, 61}, wie zum Beispiel auch Hepatozyten^{45, 64}, differenzieren können. Darüber hinaus besitzen adulte Stammzellen die Fähigkeit, mit Empfängerleberzellen zu fusionieren und dadurch an der Leberregeneration teilzunehmen^{51, 52}. Eine sehr vielversprechende Zellpopulation in diesem Zusammenhang sind mesenchymale Stammzellen (MSC) aus dem Knochenmark, die ein breites Differenzierungspotential haben, sich leicht gewinnen und *in vitro* vermehren lassen⁵⁶.

Folglich war es im Speziellen Ziel dieser Arbeit, den Beitrag von MSC durch Differenzierung oder Zellfusion an der Leberregeneration im Vergleich zu Hepatozyten im Tiermodell zu untersuchen. Hierfür wurden Ratten einer kontinuierlichen Leberschädigung durch Tetrachlorkohlenwasserstoff (CCl₄) und Allylalkohol (AA) ausgesetzt und zum Teil gleichzeitig mit Retrorsine behandelt. Letzteres ist ein potenter Inhibitor der Mitose von Leberzellen und unterbindet die Eigenregeneration der Leber⁹⁴. Zur Identifikation transplanteder Zellen wurde das Enzym Dipeptidyl-peptidase IV (DPPIV) als hepatozellulärer Marker gewählt. In einer syngenesischen Versuchsanordnung wurden aus dem Knochenmark gewonnene MSC und Hepatozyten von F344 Ratten in DPPIV-defiziente Tiere des gleichen Stammes transplantiert. Beide Varianten der F344 Ratten sind bis auf eine Punktmutation im DPPIV-Gen genetisch identisch. Immunhistochemische Färbungen wurden verwendet, um DPPIV-positive Spenderzellen im Lebergewebe zu detektieren. Nach der Injektion von Wildtyphepatozyten war die Anzahl DPPIV-positiver Zellen in der

Versuchsgruppe, die mit AA und Retrorsine behandelt wurde, höher als in Tieren, die CCl₄ in Kombination mit Retrorsine erhalten haben. Die alleinige Applikation von AA oder Retrorsine war im Gegensatz zu CCl₄ ausreichend für eine erfolgreiche Ansiedlung von Spenderhepatozyten. Die Zellen wurden sowohl über die Pfortader, als auch direkt in das Leberparenchym injiziert. Dies resultierte aber in beiden Fällen in einer gleichmäßigen Verteilung DPPIV-positiver Hepatozyten in der Leber und vergleichbaren Zellzahlen. Im Gegensatz zu den Daten der Hepatozytentransplantation konnten in keinem Empfängertier DPPIV-positive, aus Spender-ESC hervorgegangene Leberzellen nachgewiesen werden. Auch eine Stimulierung der ESC durch spezielle Kulturbedingungen zeigte keine Wirkung. Diese Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass *in vivo* weder eine Differenzierung noch Fusion von ESC stattgefunden hat, die DPPIV-exprimierende Hepatozyten generieren konnte. Distributionsversuche, die die Verteilung und den Verbleib von ESC evaluieren sollten, ergaben, dass ESC zunächst in großer Zahl im Leberparenchym zu finden waren, jedoch schon nach wenigen Tagen nur noch vereinzelt wiedergefunden werden konnten. Die in dieser Studie verwendeten ESC wurden im Vorfeld der *in vivo*-Versuche ausgiebig charakterisiert und entsprachen in allen Punkten den in der wissenschaftlichen Literatur angegebenen Kriterien⁸⁵.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, dass ESC nicht in der Lage waren, in Tierversuchen an der Leberregeneration teilzunehmen. Die hier angewandten verschiedenen künstlichen Leberschädigungsmodelle führten dagegen zu einer erfolgreichen Ansiedlung und Proliferation von transplantierten Hepatozyten, was belegt, dass die applizierten toxischen Stimuli eindeutig wirksam waren. Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass mesenchymale Stammzellen mit multipotenten Eigenschaften nicht die Fähigkeit besitzen in einem therapeutisch relevanten Umfang *in vivo* durch Differenzierung oder Zellfusion einen Beitrag an der Leberregeneration zu leisten. Die Zelltherapie mit Hepatozyten hingegen scheint für eine klinische Anwendung erfolgversprechender zu sein.

7 Abstract

In culture, Mesenchymal stem cells (MSC) can be differentiated into a variety of tissue types, including hepatocytes. MSC are easily obtained from adult bone marrow and can be expanded to large amounts *in vitro*. Thus, MSC seem to be suitable for the application in regenerative liver repair. The goal of this study was to analyze whether cultured MSC participate in liver regeneration in a rat model of prolonged toxic liver injury.

Cultured MSC from F344 rats were injected into dipeptidyl peptidase IV (DPPIV^{-/-}) deficient rats. Normal hepatocytes from wild-type animals ubiquitously express DPPIV (CD26), whereas wild-type MSC do not. Therefore the de-novo expression of DPPIV indicates MSC-to-hepatocyte plasticity. Corresponding experiments were carried out using F344 hepatocytes as a control cell population. Donor cells were directly injected into the liver parenchyma as well as into the portal vein. Toxic liver injury was achieved by applying either allyl alcohol (AA) or carbon tetrachloride (CCl₄) repeatedly. Some animals were additionally treated with retrorsine, an alkaloid that effectively inhibits hepatocyte cell division. Histochemistry and immunohistochemistry against CD26 was performed on liver cryostat sections to identify DPPIV positive donor derived cells. MSC and hepatocytes were phenotypically characterized before transplantation by FACS. Additionally GFP-labeled and BrdU-stained MSC were injected to analyze the distribution of MSC in the liver over time.

Hepatocyte transplantation led to stable hepatic engraftment in all transplanted groups. The degree of hepatocyte chimerism varied in dependency of the induction protocol applied. In contrast, transplantation of MSC did not result in the occurrence of DPPIV expressing donor derived cells in the liver. When donor hepatocytes were injected directly into the liver no or few cell clusters were identified at the injection site, donor cells were evenly distributed throughout the whole liver. The distribution of MSC in the liver was analyzed by two different methods. BrdU staining suggested that MSC stay in the liver to a certain extent. Injected MSC seem to be cleared from the liver using GFP positive MSC.

Data from this study indicates that MSC do not differentiate into hepatocytes when transplanted under regenerative conditions applying various proliferation stimuli. In contrast, syngeneic hepatocytes effectively engraft and proliferate under similar conditions.

8 Anhänge

8.1 Adipozyten-Nachweis

Red-Oil-O-Lösung:

Stammlösung:

- 175mg Red-Oil-O lösen in 50 ml Isopropanol
- Ü/N rühren im 37°C Raum
- filtrieren
- Lagerung bei 4°C

Arbeitslösung (jedes Mal frisch):

- 6ml Stammlösung mit 4 ml H₂O_{bidest} gemischt
- filtrieren

Fixierungs-Lösungen:

- 10 %ige Formaldehydlösung (10ml) (ABZUG!!):
- 2,7ml 37%ige Formaldehydlösung
- 7,3ml PBS
- 60%iger Isopropanol (5ml)
- 3ml Isopropanol
- 2ml PBS

Fixierung

- Absaugen des Differenzierungsmediums
- Waschen der wells mit je 1 ml PBS (steril)
- Unter dem Abzug nun Zugabe von je 2 ml 10 %iger Formaldehydlösung pro well
- Inkubation 5 min bei RT
- Vorsichtig abpipettieren
- well mit 1ml 60%igem Isopropanol waschen
- well trocknen lassen

Red-Oil-Färbung

- pro Well Zugabe von je 2ml Red-Oil-O-Arbeitslösung
- **Inkubation bei RT für 20 min bis 1h**
- Farblösung vorsichtig abpipettieren
- 4x mit H₂O_{bidest} waschen
- Wells mit H₂O Mikroskopieren/Photographieren

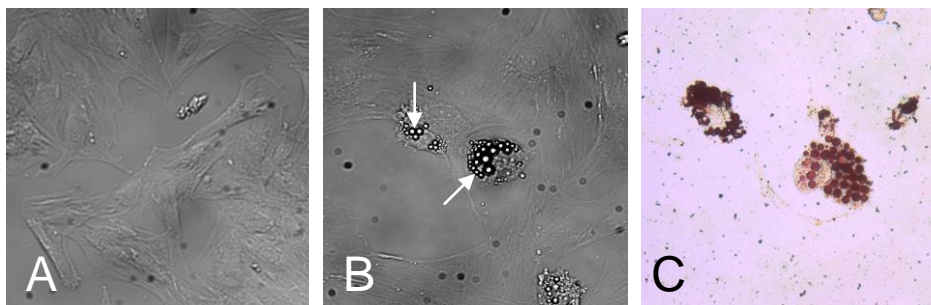


Abbildung 7-1 Beispiel für positive Färbung:

A: MSC ohne Differenzierung.

B: MSC mit Adipozytendifferenzierungsmedium (ca. 2 Wochen).

C: wie B, mit Red-Oil-O gefärbt.

8.2 Osteoblasten-Nachweis

Von Kossa Färbung in der 6-well-Platte

- wells gut mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ waschen (ansonsten flockt Silbernitrat aus und man bekommt sehr viel schwarzen Hintergrund und kaum spezifische Färbung), dafür 2-3 ml pro well zugeben, well schräg halten, H_2O auf und abziehen, mit frischem Wasser 2-mal wiederholen.
- pro well 1-2 ml 5%ige Silbernitratlsg. zugeben
- 40 min im hellen Licht inkubieren, RT
- 1-2 min unter UV-Licht halten
- gut mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ waschen (siehe 1)
- pro well 1-2 ml 1%ige Pyrogallosäure zugeben
- 5 min inkubieren
- gut mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ waschen (siehe 1)
- pro well 1-2 ml 5%ige Natriumthiosulfatlsg. zugeben
- 5 min inkubieren
- gut mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ waschen (siehe 1)
- Mikroskopieren/Photos machen

Von Kossa Färbung auf Objektträgern

- (1) bis (11) wie Färbung im 6-well
- 2 x 10 sec 70%iger Alkohol
- 2 x 10 sec 96%iger Alkohol
- 2 x 10 sec 100%iger Propanol
- 2 x 10 sec Xylol
- Eindecken mit Entellan
- Mikroskopieren/Photos machen

Unbedingt beachten:

H_2O muss immer bidest. sein, damit kein Kalk enthalten ist. Das gilt natürlich auch für das Ansetzen der Lösungen!

Benötigte Lösungen:

- 5% Silbernitratlösung

| | | |
|--------------|------|--------------------|
| Silbernitrat | 5g | |
| Aqua dest. | 95ml | unter Rühren lösen |

- 1% Pyrogallosäure

| | | |
|------------|------|--------------------|
| Aqua dest. | 50ml | |
| Pyrogallol | 0,5g | unter Rühren lösen |

- 5% Natriumthiosulfat

| | | |
|-------------------|------|--------------------|
| Aqua dest. | 95ml | |
| Natriumthiosulfat | 5g | unter Rühren lösen |

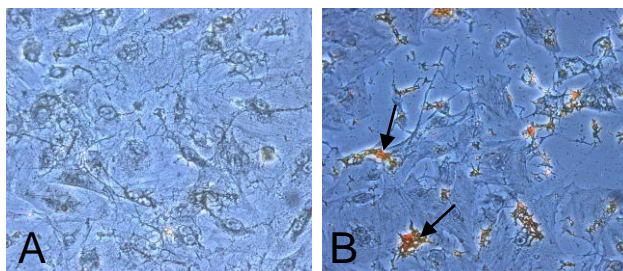


Abbildung 7-2 Beispiel für positive Färbung:

A: MSC-Fischer ohne Differenzierungsmedium, ohne FCS, 2,5 Wochen inkubiert (2mal wöchentl. Mediumswechsel).

B: MSC-Fischer mit Osteoblasten-Differenzierungsmedium, ohne FCS, 2,5 Wochen inkubiert (2mal wöchentl. Mediumswechsel).

8.3 Chondrozyten-Nachweis

Medium für Aggregate:

1. 500ml DMEM-Medium (4,5g Glucose), ohne FCS (ansonsten alles drin)
2. 1% Sodium-Pyruvat (fertige Lösung im Kühlschrank)
3. 1% IST+3
4. Wachstumsfaktoren je 1%
(Dexamethason, Ascorbinsäure, TGF-β1)

Wachstumsfaktoren:

1. Ascorbinsäure

0,1024 g L-Ascorbic Acid-2Phosphate (Trisodium salt)
20 ml Tyrodes-Lsg dazugeben, mischen, steril filtrieren
zu je 0,5 ml in Kryocups abfüllen (37 Stück)
Lagerung bei -20°C

- Tyrodes-Lösung:
0,2919g Tyrodes Salz abwiegen
0,006g NaHCO₃
300µl Pen-Strep
+ 29,7 ml H₂O bidest
alles steril filtrieren

2. Dexamethason

Fertige Lösung, die 1:10 im Medium eingesetzt wird

3. TGF-β1

12,5mg BSA (Med I) abgewogen
0,5 ml 0,1 N HCl dazugeben
(z.B. 9ml aqua bidest + 1ml M HCl; Achtung zuerst das Wasser!!!)
Zugabe von 12ml aqua bidest
alles mischen und dann steril filtrieren

- TGF-β1 Lyophilisat (2µl) in 2ml dieser Lösung lösen, indem man in 0,5 ml in dem kleinen Röhrchen das Pulver löst und dann mit je 0,5 ml das Röhrchen gründlich ausspült.

Portioniert in Eppis zu je 55 µl, Lagerung bei -80°C (RNA-Box)
(Konzentration: 10ng TGF sollen in 1ml Medium enthalten sein. Da man 1ml Medium einsetzt, braucht man 10ng TGF.
Lösung hat 2µg in 2ml = 1µg/ml = 1ng/µl ► Einsatz von 10µl)

| Bestandteil | Enkonz. | Einzusetzende Menge | Konz. der Stammlsg und Aufbewahrung |
|----------------|--------------------------------------|---------------------|---|
| DMEM high Glc | | 0,86 ml | 4°C |
| Sodium Pyruvat | 1 % (0,2µM) | 10 µl | 100 mM, 4°C |
| IST-3 | 1 % | 10 µl | 500µg I und T, 500ng S, -20°C |
| Dexamethasone | 10 ⁻⁷ bzw. 100nM bzw. 10% | 100µl | 10 ⁻⁶ , 1 ml Aliquots in Medium, -20°C |
| Ascorbinsäure | 1 % bzw. 200nM | 10 µl | 20mM, 500 µl Aliquots, -20°C |
| TGF-β1 | 1 % bzw 10 ng/ml | 10 µl | 1 µg/ml in 55 µl Aliquots, -80°C (RNA-Box) |

► Ansatz und Aggregatbildung erfolgt in einem Falcontube (15ml)

Vorgehensweise:

- MSC-Zellen werden wie gewohnt abtrypsiniert, mit dem normalen Medium (FCS etc.) gestoppt und bei 1200U, 4°C für 5 Minuten zentrifugiert
- **gründlich Nachspülen!!!**
- Resuspension erfolgt schon im **high Glucose Medium ohne FCS**
- Zellen zählen
- pro 15ml Falcon werden 200000 Zellen ausgesät mit **high Glucose Medium ohne FCS auf ca. 3ml aufgefüllt**
- Zentrifugation bei 2000U, 4°C für 5 Minuten
- Überstand vorsichtig absaugen
- Zugabe des Differenzierungsmediums, indem erst das **high Glucose Medium ohne FCS** zugegeben wird, die Zellen resuspendiert werden und dann alle Zusätze zugegeben werden (siehe Tabelle)
- Zentrifugation bei 2000U, 4°C für 5 Minuten
- Deckel der Falcontubes etwas lockern (=aufschrauben) und dann für mind. 16 Tage in den Brutschrank stellen, alle 2 Tage Mediumswechsel (Mo, Mi, Fr)

Kontrollen:

Falcontube in das nur **high Glucose Medium ohne FCS** gegeben wird aber keine weiteren Zusätze.

8.4 FACS-Messungen

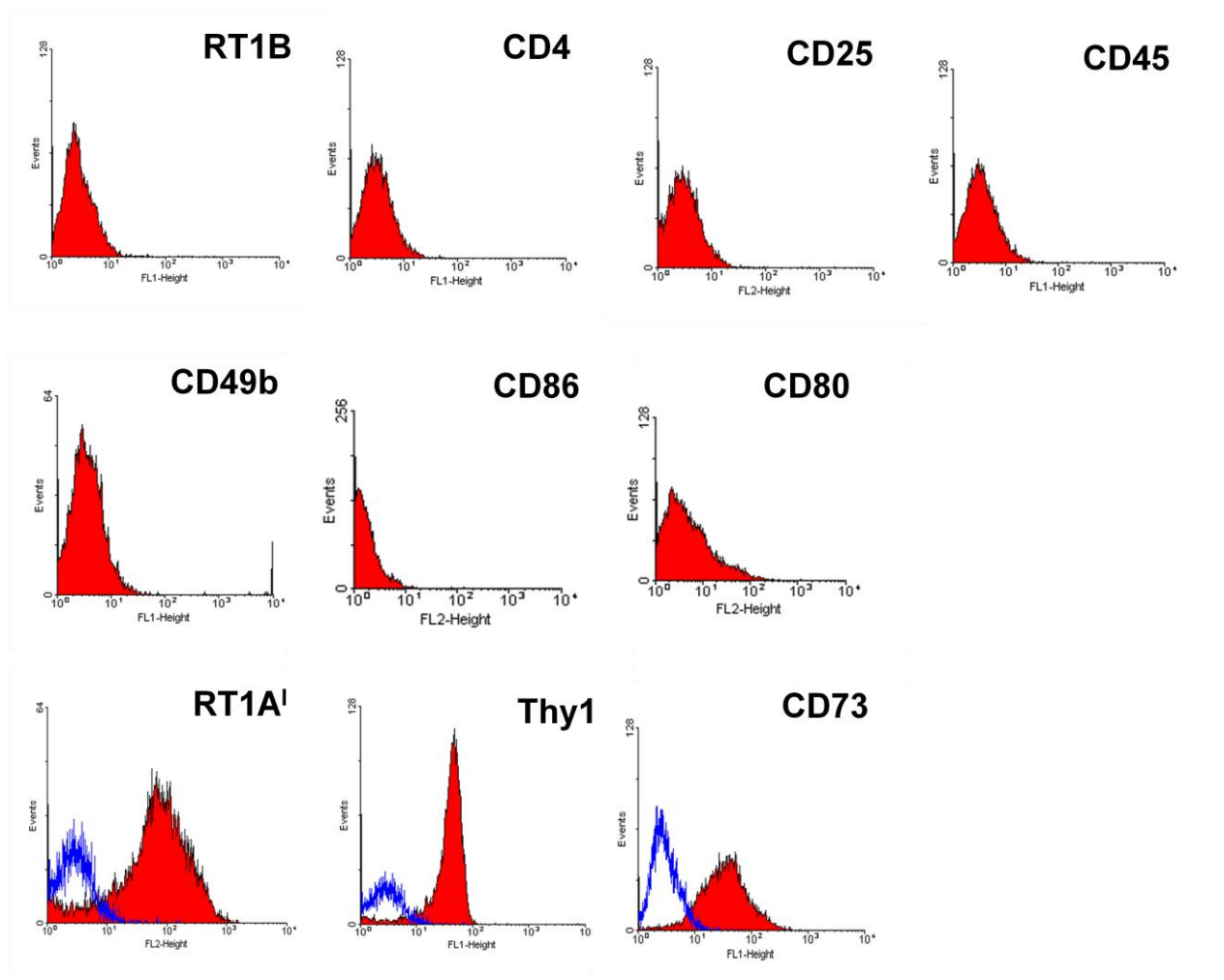


Abbildung 7-3 Ausgesuchte durchflußzytometrische Ergebnisse zur Oberflächentypisierung von MSC:

- Oberen zwei Reihen: keine Expression von MHC II, hämatopoetischer Marker oder co-stimulatorischer Moleküle (Ausnahme CD80: leicht positive Färbung, sog. „dim expression“).
- Untere Reihe: Expression von MHC I, CD90 und CD73.

8.5 Immunhistochemie

- 1. Acetonfixierung** (im Gefrierraum -sonst beschlagen die Präparate- oder am Vortag in Präparate Mappe bei -4°C lagern und Acetonfixierung bei Raumtemperatur, nachdem Mappe vorher 20 min ungeöffnet bei Raumtemperatur angewärmt wurde)
 - 1.1. Spülwanne mit Aceton zu 4/6 füllen, Einsatz einlegen.
 - 1.2. Präparate abwechselnd gerade/schräg einlegen
 - 1.3. 5-10 min fixieren
 - 1.4. Einsatz mit Metallklemme entnehmen, Aceton unter Abzug stellen, verdampfen lassen
 - 1.5. Umkreisen der Präparate mit dem Fettstift und in die Färbekammern legen, beschriften
- 2. Absorbieren mit Normalserum** (zum Abpuffern geladener Proteine auf der Zelloberfläche, dieser Schritt ist nicht unbedingt notwendig)
 - 2.1. Heterologes Serum aus der Spezies des Sekundärantikörpers (bei GAM-POX also Ziegennormalserum), 100 µl/Präparat, 1:10 verdünnt mit PBS, (in Eppi auf Eis ansetzen) oder homologes Serum (bei Ratte NRS) benutzen
 - 2.2. Präparate mit je 100 µl NRS überschichten
 - 2.3. Wasser oder PBS in hintere Rinne der Färbekammer geben, abdecken
 - 2.4. 10-20 min inkubieren, abdecken (jetzt Primärantikörper vorbereiten, Schritt 3.1)
 - 2.5. Serum auf Papiertuch abkippen, nicht waschen, mit Kleenex drumherum wischen

Präparate ab jetzt nicht mehr trocknen lassen (sonst unspezifisch positiver Hintergrund)!
- 3. Primärantikörperinkubation**
 - 3.1. Falls nicht vorhanden, Antikörper ansetzen (wie auf Zettel am Kühlschrank angegeben)
 - 3.2. Präparat mit 100 µl Antikörper (Negativkontrolle[†] mit 100 µl PBS|FACS) überschichten
 - 3.3. 30-60 min auf Schwenker unter Abzug inkubieren (jetzt Sekundärantikörper vorbereiten, Schritt 5.1)
- 4. Präparate 3x mit PBS waschen**
 - 4.1. 2 Spülwannen zu 4/6 mit PBS füllen
 - 4.2. Präparate auf Papiertuch „abschlagen“, in erste Wanne tauchen, wedeln, dann in zweite Wanne in Einsatz legen (gerade und schräg abwechselnd)
 - 4.3. Erste Wanne auskippen, mit Wasser spülen und PBS einfüllen, Einsatz in erste Wanne stellen
 - 4.4. 7 min inkubieren
 - 4.5. Zweite Wanne auskippen, mit Wasser spülen und PBS einfüllen, Einsatz in zweite Wanne stellen
 - 4.6. 8 min inkubieren
 - 4.7. 2-3 Präparate auf Papiertuch legen, von hinten und drumherum mit Kleenex abwischen, in Färbekammer legen ⇒ Sekundärantikörper überschichten, Schritt 5.2
- 5. Sekundärantikörperinkubation**
 - 5.1. Goat-anti-mouse-POX|AP bzw. Goat-anti-rat-POX|AP 1:50 verdünnt (PBS) versetzt mit 1:50 verdünntem NRS (z.B. 1000 µl Ansatz in Eppi, d.h. 20 µl GAM-POX + 20 µl NRS + 960 µl PBS) oder aber Streptavidin-POX|AP 1:200 verdünnt bei Biotin-Primärantikörper, Ansatz im Kühlschrank einen Tag lang lagerbar

[†] Es handelt sich um eine Negativkontrolle des Sekundärantikörpers, dessen unspezifische Bindung an das Gewebe bestimmt wird. Eigentlich ist auch eine Isotypkontrolle des Primärantikörpers nötig, bei der z.B. der spezifische IgG1-Mouse-anti-Rat Antikörper ein positives und ein unspez. IgG1-Mouse-anti-Rabbit Kontrollantikörper (also gleicher Isotyp, aber nicht gegen das Gewebe des Präparats gerichtet) ein negatives Signal liefern sollte.

Bei POX-Antikörper nie FACS-Medium einsetzen, Natriumazid hemmt die Peroxidaseaktivität

- 5.2. Präparate mit je 100 µl Antikörper überschichten
- 5.3. 30-60 min inkubieren (jetzt Glycingelatine lösen, Schritt 9.1, waschen vorbereiten, Schritt 6.1, Substratentwicklung vorbereiten, Schritt 7.1)
- 5.4. Präparate einzeln herausnehmen, auf Papiertuch abkippen

6. Präparate 3x mit PBS waschen

- 6.1. 2 Spülwannen zu 4/6 mit PBS füllen
- 6.2. Präparate auf Papiertuch „abschlagen“, in erste Wanne tauchen, wedeln, dann in zweite Wanne in Einsatz legen (gerade und schräg abwechselnd)
- 6.3. Erste Wanne auskippen, mit Wasser spülen und PBS einfüllen, Einsatz in erste Wanne stellen
- 6.4. 7 min inkubieren
- 6.5. Zweite Wanne auskippen, mit Wasser spülen und PBS einfüllen, Einsatz in zweite Wanne stellen
- 6.6. 8 min inkubieren
- 6.7. 2-3 Präparate auf Papiertuch legen, von hinten und drumherum mit Kleenex abwischen, in Färbekammer legen ⇒ Substrat überschichten, Schritt 7.2

7. Substratentwicklung

- 7.1. Substrat POX|AP ansetzen, falls nicht vorrätig
 - 7.1.1. POX-Ansatz im Erlenmeyerkolben: 4 mg AEC in 1 ml Dimethylformamid lösen (= Stammlösung, steht vielleicht schon im Schrank oben, neben dem Abzug, benötigt wird 1ml), unter Rühren 14 ml Na-Acetat-Puffer (0,1 mol/l, pH 5,2) mit Einmalpipette/Elektropipette und 15 µl H₂O₂ dazugeben, und in zweiten Erlenmeyerkolben filtrieren (reicht für ca. 50 Präparate, dunkel lagern, länger haltbar).
 - 7.1.2. AP-Fast Blue (Blau) bzw. Fast Red (Rot)-Ansatz: 2 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat lösen in 200 µl Dimethylformamid unter Rühren 9,8 ml 0,1M Trispuffer pH 8,2 + 3 mg Levamisole (= Stammlösung[‡], entspricht 10 ml) + 5 mg Fast Blue oder 10 mg Fast Red (bei jeder Färbung neu dazugeben) alles mixen und filtrieren
- 7.2. Präparate mit 200 µl Substrat überschichten
- 7.3. 10-20 min entwickeln, AP mindestens 30 min
- 7.4. Leitungswasser in Spülwanne geben, Einsatz einsetzen
- 7.5. Präparate auf Papiertuch abkippen, in Einsatz gerade/schräg einlegen

8. Häkalaun Gegenfärbung

- 8.1. Einsatz für 30 s in Häkalaunfärbewanne legen, wenn Häkalaun der HE-Färbung benutzt wird, sonst wird Häkalaun-Lösung 1:5 mit PBS verdünnt und 50 s gefärbt
- 8.2. Leitungswasser in Spülwanne geben, Einsatz mit Präparaten hineinsetzen
- 8.3. Schritt 8.2 mehrfach wiederholen

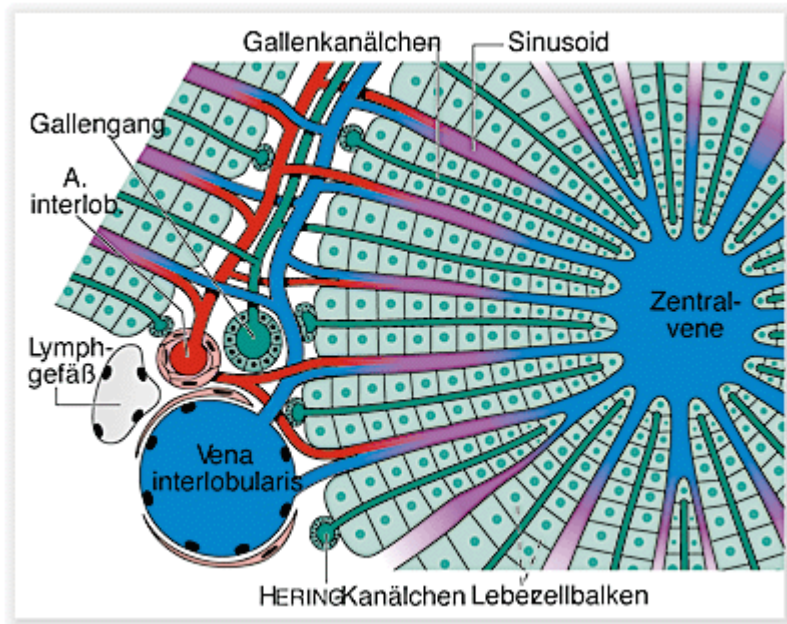
9. Eindecken

- 9.1. Glycingelatine bei 60°C im Wasserbad 20 min lösen (Zettel auf Wasserbad stellen)
- 9.2. Papiertücher ausbreiten
- 9.3. 4-6 Präparate aus Spülwanne nehmen
- 9.4. Von hinten und am weißen Bereich des Objektträgers kurz abwischen
- 9.5. Einem Klecks (alte 1ml Pipette) Glycingelatine auf das Deckglas –oder auf das Präparat- geben
- 9.6. Deckglas luftblasenfrei auflegen

Präparate bei 4°C langfristig aufbewahren

[‡] Die Stammlösung wird am besten in zehnfacher Menge angesetzt, also 98 ml Trispuffer usw. Diese Lösung kann über längere Zeit im Kühlschrank aufbewahrt werden.

8.6 Feinbau der Leber



© Urban & Fischer 2003 – Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl.

Abbildung 7-4 Schematische Darstellung der mikroskopischen Anatomie eines Leberläppchens mit dem dazugehörigen Periportalfeld. Als Hering'sche Kanälchen werden die Anfangsabschnitte der Gallengänge am Lappchenrand bezeichnet.

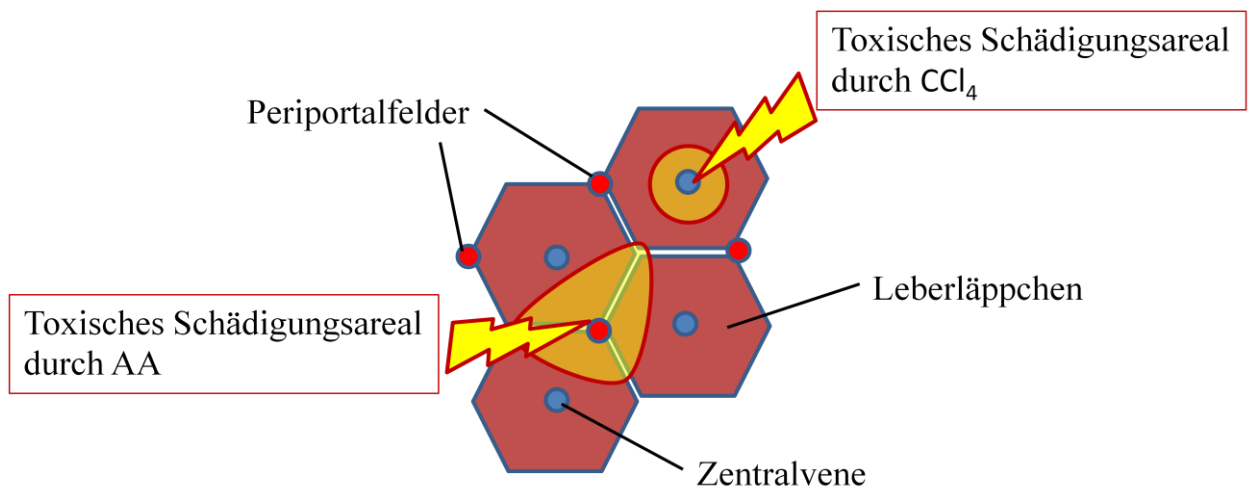


Abbildung 7-5 Schematische Darstellung der Unterschiede in der lokalen Schädigung des Leberparenchyms durch Tetrachlorkohlenwasserstoff (CCl₄) und Allylkohol (AA). CCl₄ entfaltet seine hepatotoxische Wirkung vor allem im Bereich um die Zentralvene, AA hingegen schädigt Hepatozyten in der Außenzone des Leberläppchens und am Periportalfeld.

8.7 Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| AA | Allylalkohol |
| Abb. | Abbildung |
| AEC | 3-Amino-9-Ethylcarbazol |
| Ak | Antikörper |
| bFGF | basic fibroblast growth factor |
| bio | Biotin |
| BMC | bone marrow cells (Knochenmarkszellen) |
| BrdU | 5-bromo-2-desoxyuridine |
| CaCl ₂ | Kalziumchlorid |
| CCl ₄ | Tetrachlorkohlenwasserstoff |
| CD | cluster of differentiation (Differenzierungsstruktur) |
| CFU-F | colony-forming unit fibroblastic (fibroplastische koloniebildende Einheit) |
| CK | cytokeratin |
| Corp. | Corporation |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CSF | colony stimulating factor |
| d | Tag(e) |
| dl | Deziliter |
| DMEM | Dulbecco modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DPPIV | Dipeptidyl-peptidase |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | epithelial growth factor |
| FACS | Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer |
| FAH | Fumarylacetat-Hydrolase |
| FCS | fetales Kälberserum |
| FGF | fibroblast growth factor |
| FITC | Fluoreszeinisothiozyanat (leuchtet auf Fluoreszenz 1 im FACS) |
| FL | Fluoreszenz |

| | |
|-------------------------------|---|
| FL1 | Fluoreszenz 1 der FACS-Messung |
| FL2 | Fluoreszenz 2 der FACS-Messung |
| FSC | forward scatter (korreliert mit der Zellgröße im FACS) |
| g | Gramm |
| GAM-PE | goat-anti-mouse (Ziege-anti-Maus) R-Phycoerythrin |
| GAM-POX | goat-anti-mouse Meerrettich Peroxidase |
| GAR-FITC | goat-anti-rat (Ziege-anti-Ratte) Fluoreszeinisothiocyanat |
| GFP | green fluorescent protein |
| HBM | Hepatocyte Basal Medium |
| HBSS | Hank's Buffered Salt Solution |
| HCl | Salzsäure |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| hEGF | human epithelial growth factor |
| Hep | Hepatozyten |
| HEPES | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure |
| HLA | human-histocompatibility-complex (humaner Histokompatibilitätskomplex) |
| HGF | hepatocyte growth factor |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HSC | hematopoietic stem cells (hämatopoetische Stammzellen) |
| Inc. | Incorporated |
| i.p. | intraperitoneal |
| ISCT | International Society for Cellular Therapy |
| ITS | Insulin, Transferrin, Selen |
| i.v. | intravenös |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| inf. | inferior |
| KCl | Kaliumchlorid |
| KG | Körpergewicht |

| | |
|--------------------|--|
| KHCO ₃ | Kaliumhydrogencarbonat |
| KM | Knochenmark |
| Konz. | Konzentration |
| l | Liter |
| m | milli |
| M | Molar |
| mAk | monoklonaler Antikörper |
| 2-ME | 2-Mercaptoethanol |
| min | Minute |
| Mio | Million(en) |
| MHC | major-histocompatibility-complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| MSC | mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen) |
| Na | Natrium |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NaOH | Natronlauge |
| NGS | normales (gout) Ziegenserum |
| NH ₄ CL | Ammoniumchlorid |
| NMS | normales Mausserum |
| NRS | normales Rattenserum |
| OC | oval cells |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PE | R-Phycoerythrin |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| POX | Peroxidase |
| RPMI | Rosswell Park Memorial Institute |
| RT | Rattenhistokompatibilitätskomplex |
| S. | Seite |
| SA-PE | Streptavidin R-Phycoerythrin (leuchtet auf Fluoreszenz 2) |
| SCF | stem cell factor |

| | |
|---------------|---|
| SSCB | saline-sodium citrate buffer |
| SSC | side scatter (korreliert mit der Zellgranularität im FACS) |
| Tab. | Tabelle |
| TGF α | transforming growth factor α |
| TGF β 1 | transforming growth factor β 1 |
| TNF | tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor) |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| Tsd | Tausend |
| Tx | Transplantat |
| U | Unit |
| upm | Umdrehungen pro Minute |
| V. | Vena |
| VE | vollentsalzt |

9 Literatur

1. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver Transpl* 2004;10:886-97.
2. EurotransplantInternationalFoundation. <http://www.eurotransplant.nl/files/statistics/yearly-statistics-2007.pdf>. 2007.
3. Emond JC, Freeman RB, Jr., Renz JF, Yersiz H, Rogiers X, Busuttil RW. Optimizing the use of donated cadaver livers: analysis and policy development to increase the application of split-liver transplantation. *Liver Transpl* 2002;8:863-72.
4. Broelsch CE, Frilling A, Testa G, Malago M. Living donor liver transplantation in adults. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:3-6.
5. Khuroo MS, Khuroo MS, Farahat KL. Molecular adsorbent recirculating system for acute and acute-on-chronic liver failure: a meta-analysis. *Liver Transpl* 2004;10:1099-106.
6. O'Grady J. Personal view: current role of artificial liver support devices. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1549-57.
7. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD. Hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders. *J Inherit Metab Dis* 2006;29:431-5.
8. Dan YY, Yeoh GC. Liver stem cells: a scientific and clinical perspective. *J Gastroenterol Hepatol* 2008;23:687-98.
9. Shaw BW, Jr. Auxiliary liver transplantation for acute liver failure. *Liver Transpl Surg* 1995;1:194-200.
10. Sherley JL. Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture. *Stem Cells* 2002;20:561-72.
11. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-7.
12. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001;19:193-204.
13. Dahlke MH, Popp FC, Larsen S, Schlitt HJ, Rasko JE. Stem cell therapy of the liver--fusion or fiction? *Liver Transpl* 2004;10:471-9.
14. Wang X, Montini E, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. Kinetics of liver repopulation after bone marrow transplantation. *Am J Pathol* 2002;161:565-74.
15. Popp FC, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. Therapeutic potential of bone marrow stem cells for liver diseases. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1:411-8.
16. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* 2004;39:1477-87.
17. Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, Teramoto K, Arai S, Takase K, Sato C, Terada N, Teraoka H. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes. *Hepatology* 2002;36:22-9.
18. Jones EA, Tosh D, Wilson DI, Lindsay S, Forrester LM. Hepatic differentiation of murine embryonic stem cells. *Exp Cell Res* 2002;272:15-22.
19. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett* 2001;497:15-9.
20. Cho CH, Parashurama N, Park EY, Suganuma K, Nahmias Y, Park J, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Homogeneous differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells: applications for the treatment of liver failure. *Faseb J* 2008;22:898-909.
21. Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, Ochiya T. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003;37:983-93.
22. Imamura T, Cui L, Teng R, Johkura K, Okouchi Y, Asanuma K, Ogiwara N, Sasaki K. Embryonic stem cell-derived embryoid bodies in three-dimensional culture system form hepatocyte-like cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng* 2004;10:1716-24.
23. Choi D, Oh HJ, Chang UJ, Koo SK, Jiang JX, Hwang SY, Lee JD, Yeoh GC, Shin HS, Lee JS, Oh B. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant* 2002;11:359-68.
24. Fair JH, Cairns BA, Lapaglia MA, Caballero M, Pleasant WA, Hatada S, Kim HS, Gui T, Pevny L, Meyer AA, Stafford DW, Smithies O, Frelinger JA. Correction of factor IX deficiency in mice by embryonic stem cells differentiated in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:2958-63.

25. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, Heath PR, Holden H, Andrews PW. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 2007;25:207-15.
26. Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 2007;110:3438-46.
27. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.
28. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21:105-10.
29. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-16.
30. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000;290:1779-82.
31. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
32. Suratt BT, Cool CD, Serls AE, Chen L, Varella-Garcia M, Shpall EJ, Brown KK, Worthen GS. Human pulmonary chimerism after hematopoietic stem cell transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:318-22.
33. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-70.
34. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105:829-41.
35. Wilson JW, Leduc EH. Role of cholangioles in restoration of the liver of the mouse after dietary injury. *J Pathol Bacteriol* 1958;76:441-9.
36. Theise ND, Saxena R, Portmann BC, Thung SN, Yee H, Chiriboga L, Kumar A, Crawford JM. The canals of Hering and hepatic stem cells in humans. *Hepatology* 1999;30:1425-33.
37. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis* 1987;8:1737-40.
38. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* 1989;49:1541-7.
39. Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology* 2001;120:534-44.
40. Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem Cells* 2004;22:1049-61.
41. Oh SH, Witek RP, Bae SH, Zheng D, Jung Y, Piscaglia AC, Petersen BE. Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology* 2007;132:1077-87.
42. Oertel M, Shafritz DA. Stem cells, cell transplantation and liver repopulation. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:61-74.
43. Gordon GJ, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine-induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol* 2000;156:607-19.
44. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells* 2006;24:2840-50.
45. Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med* 2007;204:1973-87.
46. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-34.
47. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-6.

48. Korbliing M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-46.
49. Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
50. Alison MR, Poulson R, Forbes SJ. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001;21:367-73.
51. Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003;422:897-901.
52. Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* 2003;422:901-4.
53. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
54. Friedenstein AY, Lalykina KS. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res* 1970;Suppl:105-6.
55. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987;20:263-72.
56. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641-50.
57. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
58. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997;6:125-34.
59. Galmiche MC, Koteliensky VE, Briere J, Herve P, Charbord P. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation pathway. *Blood* 1993;82:66-76.
60. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4857-61.
61. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-9.
62. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol* 2008;180:2581-7.
63. Chen LB, Jiang XB, Yang L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 2004;10:3016-20.
64. Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004;40:1275-84.
65. Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood* 2005;106:756-63.
66. Barry FP. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found Symp* 2003;249:86-96; discussion 96-102, 170-4, 239-41.
67. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med* 2001;344:385-6.
68. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.
69. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999;5:309-13.
70. Devine MJ, Mierisch CM, Jang E, Anderson PC, Balian G. Transplanted bone marrow cells localize to fracture callus in a mouse model. *J Orthop Res* 2002;20:1232-9.
71. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919-25; discussion 1926.

72. Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 2002;7:113-7.
73. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, Demarquay C, Cuvelier F, Mathieu E, Trompier F, Dudoignon N, Germain C, Mazurier C, Aigueperse J, Borneman J, Gorin NC, Gourmelon P, Thierry D. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 2003;5:1028-38.
74. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003;10:228-41.
75. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* 2003;57:11-20.
76. Xu G, Zhang L, Ren G, Yuan Z, Zhang Y, Zhao RC, Shi Y. Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Res* 2007;17:240-8.
77. Inoue S, Popp FC, Koehl GE, Piso P, Schlitt HJ, Geissler EK, Dahlke MH. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation* 2006;81:1589-95.
78. Fernandez M, Simon V, Herrera G, Cao C, Del Favero H, Minguell JJ. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplant* 1997;20:265-71.
79. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2003;69:250-6.
80. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003;5:32-45.
81. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008;2:313-9.
82. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-902.
83. Xu YQ, Liu ZC. Therapeutic Potential of Adult Bone Marrow Stem Cells in Liver Disease and Delivery Approaches. *Stem Cell Rev* 2008.
84. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005;7:393-5.
85. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
86. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 2003;123:702-11.
87. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, Luetzkendorf J, Tisljar K, Dollinger MM, Schormann W, Walldorf J, Hengstler JG, Fleig WE, Christ B. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 2007;56:405-15.
88. Lange C, Bassler P, Lioznov MV, Bruns H, Kluth D, Zander AR, Fiegel HC. Hepatocytic gene expression in cultured rat mesenchymal stem cells. *Transplant Proc* 2005;37:276-9.
89. Ong SY, Dai H, Leong KW. Hepatic differentiation potential of commercially available human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng* 2006;12:3477-85.
90. Chamberlain J, Yamagami T, Colletti E, Theise ND, Desai J, Frias A, Pixley J, Zanjani ED, Porada CD, Almeida-Porada G. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep. *Hepatology* 2007;46:1935-45.
91. Michalopoulos GK. Liver regeneration. *J Cell Physiol* 2007;213:286-300.
92. Overturf K, al-Dhalimy M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Serial transplantation reveals the stem-cell-like regenerative potential of adult mouse hepatocytes. *Am J Pathol* 1997;151:1273-80.
93. Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Pathol* 2003;163:1301-11.
94. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 1998;153:319-29.

95. Laconi S, Curreli F, Diana S, Pasciu D, De Filippo G, Sarma DS, Pani P, Laconi E. Liver regeneration in response to partial hepatectomy in rats treated with retrorsine: a kinetic study. *J Hepatol* 1999;31:1069-74.
96. Laconi S, Pillai S, Porcu PP, Shafritz DA, Pani P, Laconi E. Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 2001;158:771-7.
97. Dahlke MH, Popp FC, Bahlmann FH, Aselmann H, Jager MD, Neipp M, Piso P, Klempnauer J, Schlitt HJ. Liver regeneration in a retrorsine/CCl4-induced acute liver failure model: do bone marrow-derived cells contribute? *J Hepatol* 2003;39:365-73.
98. Sell S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells. *Hepatology* 2001;33:738-50.
99. McLean EK. The toxic actions of pyrrolizidine (senecio) alkaloids. *Pharmacol Rev* 1970;22:429-83.
100. Gorrell MD. Dipeptidyl peptidase IV and related enzymes in cell biology and liver disorders. *Clin Sci (Lond)* 2005;108:277-92.
101. Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 1976;13:29-83.
102. Rechnagel RO, Glende EA, Jr. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of lethal cleavage. *CRC Crit Rev Toxicol* 1973;2:263-97.
103. Farber JL, El-Mofty SK. The biochemical pathology of liver cell necrosis. *Am J Pathol* 1975;81:237-50.
104. Yavorkovsky L, Lai E, Ilic Z, Sell S. Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol. *Hepatology* 1995;21:1702-12.
105. Atzori L, Dore M, Congiu L. Aspects of allyl alcohol toxicity. *Drug Metabol Drug Interact* 1989;7:295-319.
106. Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microsc* 2005;217:1-15.
107. Yuste R. Fluorescence microscopy today. *Nat Methods* 2005;2:902-4.
108. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol* 2006;7:14.
109. Bubnic SJ, Nagy A, Keating A. Donor hematopoietic cells from transgenic mice that express GFP are immunogenic in immunocompetent recipients. *Hematology* 2005;10:289-95.
110. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003;101:2999-3001.
111. Prockop DJ. "Stemness" does not explain the repair of many tissues by mesenchymal stem/multipotent stromal cells (MSCs). *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:241-3.
112. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, Sobel BE, Delafontaine P, Prockop DJ. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:700-6.
113. Swanger SA, Neuheuser B, Himes BT, Bakshi A, Fischer I. Analysis of allogeneic and syngeneic bone marrow stromal cell graft survival in the spinal cord. *Cell Transplant* 2005;14:775-86.
114. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769-78.
115. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology* 2006;43:S45-53.
116. Gupta S, Chowdhury JR. Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:439-46.
117. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32:19-31.
118. Evarts RP, Hu Z, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ* 1993;4:555-61.
119. Lavon N, Benvenisty N. Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 2005;96:1193-202.
120. Francois S, Bensidhoum M, Mouisseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Sache A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 2006;24:1020-9.
121. Neuss S, Becher E, Woltje M, Tietze L, Jahnke-Dechent W. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. *Stem Cells* 2004;22:405-14.

122. Swart GW. Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. *Eur J Cell Biol* 2002;81:313-21.
123. Sujata L, Chaudhuri S. Stem cell niche, the microenvironment and immunological crosstalk. *Cell Mol Immunol* 2008;5:107-12.
124. Bentzon JF, Stenderup K, Hansen FD, Schroder HD, Abdallah BM, Jensen TG, Kassem M. Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:633-40.
125. Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 2001;19:219-25.
126. Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV. Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 2005;115:1743-55.
127. Ma Y, Xu Y, Xiao Z, Yang W, Zhang C, Song E, Du Y, Li L. Reconstruction of chemically burned rat corneal surface by bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:315-21.
128. Lu P, Blesch A, Tuszynski MH. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J Neurosci Res* 2004;77:174-91.
129. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *Apmis* 2005;113:831-44.
130. Neuhofer B, Gallo G, Howard L, Kostura L, Mackay A, Fischer I. Reevaluation of in vitro differentiation protocols for bone marrow stromal cells: disruption of actin cytoskeleton induces rapid morphological changes and mimics neuronal phenotype. *J Neurosci Res* 2004;77:192-204.
131. Sgodda M, Aurich H, Kleist S, Aurich I, Konig S, Dollinger MM, Fleig WE, Christ B. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 2007;313:2875-86.
132. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002;21:5483-95.
133. Oyagi S, Hirose M, Kojima M, Okuyama M, Kawase M, Nakamura T, Ohgushi H, Yagi K. Therapeutic effect of transplanting HGF-treated bone marrow mesenchymal cells into CCl4-injured rats. *J Hepatol* 2006;44:742-8.
134. Zhao DC, Lei JX, Chen R, Yu WH, Zhang XM, Li SN, Xiang P. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against experimental liver fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* 2005;11:3431-40.
135. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F, Bou-Gharios G, Jeffery R, Iredale JP, Forbes SJ. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006;130:1807-21.
136. Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 2008;18:500-7.
137. Alison MR, Lovell MJ, Direkze NC, Wright NA, Poulson R. Stem cell plasticity and tumour formation. *Eur J Cancer* 2006;42:1247-56.
138. Kucia M, Reza R, Campbell FR, Zuba-Surma E, Majka M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006;20:857-69.
139. Popp FC, Slowik P, Eggenhofer E, Renner P, Lang SA, Stoeltzing O, Geissler EK, Piso P, Schlitt HJ, Dahlke MH. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem Cells* 2007;25:639-45.
140. Roche Lexikon Medizin, 5. Aufl. Urban & Fischer 2003

10 Lebenslauf

Nachname: Slowik
Vornamen: Przemyslaw Krzysztof
Eltern: Janina Slowik, geb. Hardzina,
Jacek Slowik
Geburtsdatum: 27.03.1983
Geburtsort: Babice (Polen)
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: polnisch



Ausbildung

1989 Einschulung, Grundschule Clausthal-Zellerfeld
1993 Kepler-Gymnasium Weiden
2002 Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife
2002 Immatrikulation an der Medizinischen Fakultät der Universität
Regensburg, Studiengang Humanmedizin
2004 1. Staatsexamen (Physikum)
2005-20011 Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität
Regensburg
2006 Forschungssemester an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der
Universität Regensburg
2008 Forschungssemester am Department of Medicine, University of
California, San Diego, USA
2008 Praktisches Jahr
2009 2. Staatsexamen
2010 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der
Universität Regensburg

Regensburg, den 12. September 2011

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Experimentelle Studie zur Untersuchung des regenerativen Potentials mesenchymaler Stammzellen in einem chronischen Leberschädigungsmodell“

in der Abteilung der Chirurgischen Forschung der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn PD Dr. med. Marc H. Dahlke ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner anderen in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch wurde diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Teile der eigenen Daten wurden in Zusammenarbeit bereits von Dr. med. Felix Popp präsentiert und publiziert¹³⁹.

Regensburg, den 12. September 2011

12 Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn PD Dr. med. Marc-Hendrik Dahlke, Oberarzt der Klinik für Chirurgie der Universität Regensburg, und Herrn Dr. med. Felix C. Popp für die ausgezeichnete Betreuung und das außerordentliche Engagement bei der Durchführung der vorliegenden Doktorarbeit. Dr. Dahlke und Dr. Popp waren mir stets hervorragende Lehrer sowohl im Bereich der experimentellen Forschung als auch in der klinischen Praxis und stellten mir alle Mittel zur Verfügung, die zum erfolgreichen Abschluss der Arbeit nötig waren. Ich hoffe inständig, dass wir unsere Zusammenarbeit in Zukunft fortsetzen können und ich so weiterhin die Möglichkeit bekomme von ihnen zu lernen.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer, die mir nicht nur praktisch bei der Durchführung vieler Versuche geholfen hat, aber vor allem mit ihrem Sachverstand und ihrer herzlichen Art die Forschungsarbeit wesentlich erleichtert hat.

Gleichermaßen gebührt der Dank Herrn Prof. Dr. med. Pompiliu Piso, leitenden Oberarzt der Klinik für Chirurgie der Universität Regensburg, für die fortwährende Motivation und Unterstützung, die einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen der Arbeit erbracht haben.

Ich danke an dieser Stelle auch Prof. Dr. med. Hans-Jürgen Schlitt, Ordinarius der Klinik für Chirurgie der Universität Regensburg, und Prof. Edward K. Geissler, Leiter der experimentellen Chirurgie der Universität Regensburg, für ihre prägnanten Kommentare und Hinweise, die Bereitstellung aller labortechnischen Möglichkeiten sowie eine inspirierende wissenschaftliche Arbeitsatmosphäre.

In diesem Zusammenhang gebührt auch meinen studentischen Kollegen in der Arbeitsgruppe Dank, allen voran meinem Freund Philipp Renner, auf dessen geistreiche Einfälle und Kommentare, moralische sowie praktische Hilfestellung ich mich immer verlassen konnte. Ich freue mich auf eine weitere Zusammenarbeit mit ihm.

Des Weiteren danke ich im Besonderen Frau Barbara Jung, MD, Assistant Professor of Medicine, University of California, San Diego, für die Bereitstellung von Ressourcen zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit während meines Forschungsaufenthaltes in

Kalifornien und für ihre reichhaltige wissenschaftliche Expertise, mit der sie mir jederzeit zur Seite stand.

Frau Irina Kuçuk, MTA in der experimentellen Chirurgie der Universität Regensburg, danke ich herzlichst für die exzellente technische Einarbeitung in fast alle Labormethoden, ihre Unterstützung bei einer Vielzahl von Experimenten und ihre Geduld, die sie mir während meiner Einarbeitungsphase entgegengebracht hat. Denn zeitaufwändige Tierversuche wurden in den meisten Fällen unter ihrer Aufsicht durchgeführt, wenn Dr. Popp oder Dr. Dahlke wegen klinischen Verpflichtungen nicht zur Verfügung standen.

Ich danke auch allen weiteren Mitarbeitern im Labor der experimentellen Chirurgie der Universität Regensburg für die gute Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre. Besonders zu erwähnen ist hierbei Frau Dr. rer. nat. Gudrun Köhl, die stets mit hilfreichen Anmerkungen und praktischen Hinweisen vor allem bei tierexperimentellen Fragestellungen zur Stelle war.

Schließlich danke ich meiner Mutter, Janina Slowik-Ulrich, und meinem Stiefvater, Christian Ulrich, sowie meinem leiblichen Vater, Jacek Slowik, für den immerwährenden moralischen und finanziellen Beistand während meiner Zeit als Medizinstudent und Doktorand. Ohne ihre Unterstützung wären Famulaturen, Forschungsaufenthalte und PJ-Praktika im Ausland kaum möglich gewesen. Insbesondere meine Mutter war mir während meiner bisherigen Laufbahn stets Motivation und Inspiration. Dies gilt gleichermaßen auch für meinen Bruder, Slawomir Slowik, dem ich zudem die Hilfe bei der Datenverarbeitung für diese Doktorarbeit verdanke. Darüber hinaus danke ich allen meinen Freunden und Studienkollegen dafür, dass sie mich all die Jahre begleitet und unterstützt haben. Stellvertretend für alle sei hier Christian Eimer, Andreas Fisser, Sebastian Frieling und Florian Segerer für ihre Treue und Hilfe gedankt.