

Isolation und Charakterisierung einer Vorläuferzell- population aus humanen Leberteilresektaten



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV
– Chemie und Pharmazie –
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Monika Lichtenauer
aus Waldkirchen
2010

Kolloquium: 02.03.2010

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. G. Schmeer (Vorsitzender)
Prof. Dr. A. Göpferich (1. Gutachter)
PD Dr. T. Weiss (2. Gutachter)
Prof. Dr. A. Buschauer (3. Prüfer)

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von August 2001 bis September 2005 an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg.

Die externe Betreuung übernahm PD Dr. T. Weiss, fakultätsintern wurde die Arbeit durch Prof. Dr. A. Götferich (Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Technologie der Universität Regensburg) betreut.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Therapie des akuten und chronischen Leberversagens	1
1.2 Leberregeneration	5
1.2.1 Leberregeneration durch hepatische Vorläuferzellen	7
1.2.2 Leberregeneration durch hematopoietische Stammzellen	9
2 Problemstellung	10
3 Ergebnisse	12
3.1 Nachweis von möglichen Vorläuferzellpopulationen in humanem Lebergewebe	12
3.2 Isolation von nichtparenchymalen Zellfraktionen	16
3.3 Charakterisierung der nichtparenchymalen Zellfraktion	19
3.3.1 Ausbeute und Vitalität	19
3.3.2 Korrelation der Ausbeute mit der Histologie des Gewebes	21
3.3.3 Expression von Oberflächenmarkern	23
3.3.4 Hematopoietisches Potential	27
3.4 Isolation von CD90+ Zellen aus NPC-Fraktionen	28
3.5 Charakterisierung der CD90+ Fraktion	30
3.5.1 Expression von Vorläuferzellmarkern	30
3.5.2 Expression von hepatischen Markern	34
3.6 Zellkultur von CD90+ Zellen	37
4 Diskussion	42
4.1 Nachweis von möglichen Vorläuferzellen in humanem Lebergewebe	42
4.2 Isolation von nichtparenchymalen Zellen	47
4.3 Charakterisierung der nichtparenchymalen Fraktion	49
4.4 Isolation von CD90+ Zellen	51

4.5	Charakterisierung der CD90+ Zellen	52
4.6	Zellkultur von CD90+ Zellen	54
4.7	Hepatische Vorläuferzellen als Lebertherapeutikum	56
5	Zusammenfassung	59
6	Experimenteller Teil	62
6.1	Allgemeine Angaben	62
6.1.1	Geräte	62
6.1.2	Chemikalien und Reagenzien	63
6.1.3	Materialien	64
6.1.4	Lösungen und Puffer	65
6.1.5	Zellkulturmedien	67
6.1.6	Enzyme	68
6.1.7	Zelllinien	69
6.1.8	Molekularbiologische Systeme	69
6.1.9	Antikörper	70
6.1.9.1	Antikörper und Isotypkontrollen für die Immunhistochemie	70
6.1.9.2	Antikörper und Isotypkontrollen für die Durchflusszytometrie	71
6.1.9.3	Antikörper für die immunomagnetische Isolation von Zellen	71
6.1.10	PCR-Primer	72
6.1.11	Software	72
6.2	Methoden	73
6.2.1	Immunhistochemie	73
6.2.1.1	Vorbereiten der Präparate	73
6.2.1.1.1	Gefrierschnitte	73
6.2.1.1.2	Zytospin-Präparate	74
6.2.1.1.3	Fixieren von kultivierten Zellen	74
6.2.1.2	Färbeprotokolle	74
6.2.1.2.1	Färbung nach der APAAP-Methode	74

6.2.1.2.2 Doppel-Fluoreszenzfärbung	76
6.2.2 Zellisolation	77
6.2.2.1 Isolation der nichtparenchymalen Zellfraktion	77
6.2.2.2 Isolation von CD90+ Zellen	78
6.2.3 Durchflusszytometrie	79
6.2.4. CFU-Assays	79
6.2.5 RNA-Isolation	80
6.2.5.1 Vorbereiten von kultivierten Zellen für die RNA-Isolation	80
6.2.5.2 Isolationsprotokoll	80
6.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA	80
6.2.6 Polymerase Kettenreaktion	81
6.2.6.1 Reverse Transkription	81
6.2.6.2 PCR	81
6.2.7 Gelelektrophorese	83
6.2.8 Zellkultur	83
 Publikationen	84
 Literaturverzeichnis	86
 Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AAF	2- Acetylaminofluoren
Abb.	Abbildung
AFP	α -Fetoprotein
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
ALD	Alcoholic liver disease
ALR	Augmentor of liver regeneration
APAAP	Alkalische Phosphatase / Anti-Alkalische Phosphatase
BFU-E	Burst forming unit-erythroid
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
CFU-E	Colony forming unit-erythroid
CFU-GEMM	Colony forming unit-granulocyte-erythroid-makrophage-megakaryocyte
CFU-GM	Colony forming unit-granulocyte-monocyte
ChromA	Chromogranin A
CK	Cytokeratin
D	Diszescher Raum
DEPC	Diethyl Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's minimum essential Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
D-PBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
EBSS	Earle's balanced salt solution
EDTA	Ethylenediamintetraacetic acid
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
Ep-CAM	Epithelial cell adhesion molecule
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward scatter

h	Stunde
HEA	Human epithelial antigen
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HGF	hepatic growth factor
HIV	Humaines Immundefizienz Virus
HTCR	Human tissue and cell research
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
ITS	Insulin/Transferrin/Selen
kDa	Kilodalton
MACS	Magnetic activated cell sorting
min	Minuten
M2-PK	M2-Pyruvatkinase
NAFLD	Nonalcoholic fatty liver disease
NPC	Nonparenchymal cell
OD	Optische Dichte
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PCR	Polymerase chain reaction
PH	Partielle Hepatektomie
PI	Propidiumiodid
PP	Perfusionspuffer
P/S	Penicillin/Streptomycin
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
PT	Portaltrakt
RNA	Ribonucleic acid
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
S	Sinusoid
SIP	Stock isotonic percoll
SMA- α	Smooth muscle actin α
SSC	Side scatter
Tab.	Tabelle

TBE	Tris/Borat/EDTA
TGF	Transforming growth factor
TR	Texas Red
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
VIS	Visible

1 Einleitung

1.1 Therapie des akuten und chronischen Leberversagens

Mit einem Gewicht von ca. 1,5 kg (2,3-3 % des Körpergewichtes) ist die Leber die größte exokrine Drüse des menschlichen Körpers. Als zentrales Stoffwechselorgan hat sie eine Vielzahl von lebenswichtigen Aufgaben zu erfüllen. In ihr laufen die meisten der bekannten Reaktionen des Intermediärstoffwechsels ab, sie ist der Ort der Synthese vieler für den Organismus wichtiger Verbindungen, in ihr werden körpereigene und körperfremde Stoffe metabolisiert und sie ist ein wichtiges Ausscheidungsorgan¹. Ihre Kapazität zur Erfüllung dieser Aufgaben ist enorm hoch. Erst bei einem Verlust von mehr als 90% der Parenchymzellen stirbt der zugehörige Organismus². Durch diese hohe Kapazität der Leberzellen und das große Regenerationspotential der Leber im Falle von Schädigungen ist sie in der Lage, ihre Funktion auch im Falle sowohl von akuten als auch chronischen Schäden weitgehend aufrecht zu erhalten. Durch eine Reihe von Erkrankungen wie z.B. eine Leberzirrhose, verursacht durch Hepatitis B oder C, Autoimmunhepatitis, primär biliäre Zirrhose (PBC), primär sklerosierende Cholangitis (PSC), verschiedene Stoffwechselerkrankungen oder ein fulminantes Leberversagen, z.B. als Folge durch Paracetamolvergiftung, wird jedoch dieser „Selbstheilungsprozess“ und damit die Funktionsfähigkeit der Leber vollständig außer Kraft gesetzt, was ohne Therapie schnell zum Tod des Patienten führt. Da im Gegensatz zu anderen Organen, wie Herz oder Niere, zum heutigen Zeitpunkt für die Leber keine geeigneten Ersatztherapien wie Dialyse oder Herz-Lungen Maschine existieren, kann eine erfolgreiche Therapie nur darin bestehen, eine derart erkrankte Leber zu ersetzen³. Die derzeit einzige in größerem Umfang klinisch anwendbare Methode mit guten Langzeiterfolgen ist die Lebertransplantation. Neben Abstoßungsreaktionen und Erkrankungen der Patienten, die aufgrund der erforderlichen Behandlung mit Immunsuppressiva entstehen, besteht das Hauptproblem bei dieser Therapie in der zu geringen Anzahl an geeigneten Spenderorganen. Im Jahr 2007 wurden in Deutschland 1096 Lebertransplantationen nach postmortaler Leberspende durch-

geführt und 60 Transplantationen nach Lebendspenden. Demgegenüber standen im gleichen Jahr 1590 Patienten auf der Warteliste von Eurotransplant⁴.

Eine Methode, um die Anzahl an Transplantationen erhöhen zu können, ist die split liver Transplantation, bei der der rechte und linke Leberlappen getrennt in zwei Empfänger transplantiert werden. Jedoch zeigten die Studien von Alessandro Giacomoni vom Niguarda Krankenhaus in Mailand, dass die Ein-Jahres-Überlebensraten bei split liver Transplantationen im Vergleich zu einer Transplantation der kompletten Leber deutlich erniedrigt waren⁵.

Eine weitere Möglichkeit, an der seit den 90er Jahren intensiv geforscht wird, und die helfen könnte, den Mangel an Spenderorganen auszugleichen, ist die Xenotransplantation. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Organübertragung von anderen Spezies, z.B. von Schweinen auf den Menschen. Die Idee der Organübertragung vom Tier auf den Menschen ist nicht neu, die ersten derartigen Transplantationen wurden bereits Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt mit der Übertragung der Nieren von z.B. Kaninchen und Rhesusaffen in Menschen⁶. Neben der Frage, ob eine derartige Methode ethisch gerechtfertigt werden kann, besteht das Hauptproblem der Xenotransplantation in einer erhöhten Abstoßung der transplantierten Organe, die mit den gegenwärtig verfügbaren Immunsuppressiva nicht kontrolliert werden kann. Zudem birgt diese Methode auch die Gefahr der Übertragung von tierischen Viren auf die Empfänger in sich, wodurch die Entstehung von neuen Epidemien, vergleichbar z.B. mit AIDS, begünstigt werden könnte. Außerdem unterscheiden sich die Organe von vielen in Frage kommenden Tieren in Größe, Aufbau und vor allem in der Funktion z.T. zu stark von menschlichen Organen und sind daher für eine Transplantation nicht geeignet⁷.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz, der entweder als Therapie bestimmter genetisch bedingter Lebererkrankungen angewandt werden kann oder als Überbrückung zur orthotopen Lebertransplantation dienen kann⁸, besteht in der Transplantation von Leberzellen. Bereits 1976 konnte Arthur Matas an der Universität in Minnesota im Tiermodell zeigen, dass Hepatozyten, die über die Pfortader transplantiert wurden, in der Empfängerleber überleben und dort genetisch determinierte metabolische Störungen korrigieren können. Bei dem verwendeten Modell handelte es sich um Gunn-Ratten, welche an einem UDP-Glucoronyltransferase Defizit leiden und daher als Modell für das humane Crigler-Najar-Syndrom I verwendet werden. Durch die Transplantation von Hepatozyten gesunder Spendertiere wurden die Plasmobilirubinkon-

zentrationen innerhalb des Beobachtungszeitraums von drei Monaten signifikant reduziert⁹. Auch beim Menschen sind bereits die ersten Therapieversuche durch die Transplantation von Hepatozyten dokumentiert. In Japan führten 1992 Mito et al. an zirrhotischen Patienten autologe Leberzelltransplantationen in die Milz durch. Auch nach über einem halben Jahr konnten die integrierten Zellen noch nachgewiesen werden¹⁰. In den USA wurde 1994 die erste leberspezifische *ex vivo* Gentherapie an einer Patientin mit familiärer Hypercholinesterinämie erfolgreich durchgeführt¹¹.

Alle bisher durchgeführten Zelltransplantationen zeigen, dass diese Methode komplikationsfrei durchgeführt werden kann und dass dadurch kurzfristig eine Verbesserung der klinischen Symptome erreicht werden kann. Eine längerfristige Verbesserung, vergleichbar mit den Erfolgen, die durch eine Lebertransplantation erzielt werden können, konnte durch eine Zelltransplantation bisher allerdings noch nicht erreicht werden.

Die Gründe dafür liegen zunächst in der Qualität der transplantierten Zellen. Die bisher verwendeten Zellen stammten zum Großteil aus explantierten Lebern, die wegen schlechter Organqualität nicht transplantiert werden konnten, was sich natürlich auch auf die Qualität der daraus gewonnenen Zellen entsprechend auswirkte. Zudem werden die Zellen im Verlauf der Isolation ebenfalls geschädigt und damit die Funktionalität der gewonnenen Zellfraktionen weiter eingeschränkt. Ideal für die Zelltransplantation wären intakte Zellen mit hoher Vitalität, um einen Überlebensvorteil der transplantierten Zellen gegenüber den kranken Zellen zu gewährleisten.

Ein weiterer einschränkender Faktor ist die Anzahl an Zellen, die benötigt wird, um sicherzustellen, dass eine ausreichende Anzahl an Zellen in die Leber integriert wird, die in der Lage ist, die in der Leber ablaufenden komplexen metabolischen Aufgaben zu kompensieren oder eine Regeneration der Leber in Gang zu bringen. Zwar ist das Replikationspotential der Hepatozyten sehr hoch, wie in unterschiedlichen Tiermodellen, in denen das Wachstum und die Funktion der Hepatozyten gestört war, gezeigt werden konnte. In diesen Modellen wurde nachgewiesen, dass bereits eine kleine Anzahl an transplantierten Hepatozyten ausreicht, um den Defekt zu korrigieren¹² bzw. dass Hepatozyten auch nach mehreren seriellen Transplantationen noch in der Lage sind, zu proliferieren und die zerstörten Zellen zu ersetzen¹³. Da jedoch auch transplantierte Zellen, ebenso wie die kompletten Organe bei der Organtransplantation, vom Immunsystem des Empfängerorganismus als „fremd“ erkannt und zerstört werden, muss die transplantierte Ausgangszellzahl entsprechend hoch sein, um die-

sen Verlust auszugleichen. Für erfolgreiche Zelltransplantationen werden in der Literatur im Rattenmodell Zellzahlen von 10×10^6 ¹⁴ bis 200×10^6 ¹⁵ beschrieben. Bei den meisten Autoren wurden die Transplantationen mit Zellzahlen im Bereich von $20 - 50 \times 10^6$ durchgeführt^{16,17}.

Eine wichtige Voraussetzung für die Zelltransplantation ist daher eine möglichst gleichbleibende Qualität der zu transplantierenden Zellen und eine möglichst große Ausbeute an vitalen Zellen bei den Isolationen. Die Isolation dieser Zellen müsste jedoch aus Lebergewebe von guter Qualität erfolgen, wodurch die Zelltransplantation automatisch in Konkurrenz zur Lebertransplantation treten würde.

Damit die Zelltransplantation parallel und in Ergänzung zur Organtransplantation als Therapiemethode in der Klinik Einzug finden kann, muss eine Methode gefunden werden, mit der die verfügbare Zellzahl erhöht werden kann, ohne dadurch die zur Transplantation verfügbaren Organe zu sehr zu verringern. Es muß also zum einen versucht werden, die Ausbeute an transplantierbaren Zellen sowohl aus erkranktem Gewebe als auch aus Leberzellresektaten zu steigern und andererseits eine Möglichkeit gefunden werden, die isolierten Zellen ohne Verlust ihrer Funktionalität weiter zu expandieren. Da sich humane Hepatozyten jedoch in Zellkultur nicht oder nur in sehr geringem Maß teilen, werden stattdessen Zellpopulationen benötigt, die sowohl kultiviert werden können als auch in der Lage sind, nach einer Transplantation die Regeneration der Leber wieder in Gang zu bringen.

1.2 Leberregeneration

Unter Regeneration (lat. regenerare: von neuem hervorbringen) versteht man das Wiederherstellen eines Ausgangszustandes nach einer Veränderung. Bereits die Menschen in der Antike wussten um die Fähigkeit der Leber „nachzuwachsen“ (vgl. Prometheus-Sage)¹⁸, d.h. ihren „Ausgangszustand“ nach einem Zellverlust wiederherzustellen.

Ein geeignetes experimentelles Modell, um die Vorgänge in der regenerierenden Leber zu untersuchen, wurde von Higgins und Anderson bereits 1931 entwickelt.¹⁹ Dabei werden bei Ratten operativ bis zu 70% des Lebergewebes entfernt (partielle Hepatektomie, PHx). Als Antwort auf den Verlust der Lebermasse beginnen die verschiedenen Zellpopulationen der Leber zu proliferieren. Bereits wenige Stunden nach der Hepatektomie beginnt die DNA-Synthese in den Hepatozyten, die 24 h nach der Operation ihren Höhepunkt erreicht. Die DNA-Synthese in den übrigen Zellen setzt ca. 24 h nach den Hepatozyten ein, mit einem „Peak“ bei den Gallengangszellen ca. 36 h nach der Operation, bei den Kupffer-Zellen und Ito-Zellen ca. 48 h nach dem Eingriff. Als letzte Zellpopulation proliferieren die Sinusendothelzellen, deren Proliferationsrate ca. 96 h nach der partiellen Hepatektomie ihr Maximum erreicht (s. Abb. 1). Nach 5-7 Tagen ist die Regeneration der Leber abgeschlossen.

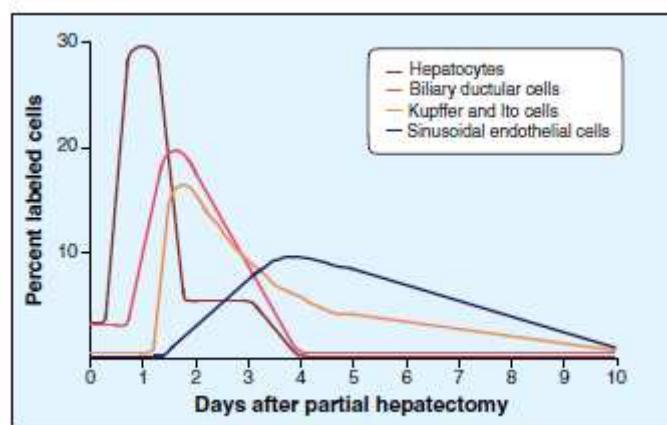


Abb. 1: Kinetik der DNA-Synthese in den verschiedenen Leberzellpopulationen nach partieller Hepatektomie²⁰

Der Prozess der Regeneration wird durch das Einwirken verschiedener Regulatoren (Stimuli, Inhibitoren) gesteuert. Der Zellverlust führt für die im restlichen Organ verbliebenen Leberzellen zu einem relativen Überschuss an Ionen, Nährstoffen und Hormonen. Dieser „metabolic overload“²¹ kann als Initiator dienen und ermöglicht den Übergang der Hepatozyten von der G0 in die G1 Phase des Zellzyklus („Priming“)²². Wachstumsfaktoren wie TGF- α ²³, HGF²⁴ und EGF²⁵ ermöglichen den Hepatozyten das Überwinden des G1-Restriktionspunktes und das Durchlaufen des Zellzyklus, weswegen diese Substanzen als Progressors bezeichnet werden. Durch das Einwirken von weiteren Verbindungen, den sogenannten Augmentors, zu denen u.a. Insulin²⁶, ALR²⁷ und Cyclosporin A²⁸ gehören, wird die Proliferationsrate zusätzlich unterstützt. Durch verschiedene Inhibitoren wie TGF- β ²⁹, IL-1³⁰ und Rapamycin³¹ wird die Proliferation der Zellen und damit die Regeneration schließlich beendet. Die Regenerationskapazität der Leber ist dabei fast unbegrenzt. Bei Versuchen an Ratten regenerierten die Lebern auch nach 12 aufeinanderfolgenden partiellen Hepatektomien noch vollständig³².

In weiteren Studien wurde gezeigt, dass die Regeneration nicht alleine auf einen Zellverlust durch einen operativen Eingriff oder die Schädigung der Zellen durch das Einwirken von Toxinen wie Alkohol oder verschiedenen Medikamenten beschränkt ist. Ein „Zellunderschuss“ kann ebenso bei der Transplantation einer kleinen Leber in einen großen Empfänger („small for size“ transplant)³³ entstehen. Starzl et. al. konnten 1993 zeigen, dass bei der Transplantation von Lebern aus Affen in Menschen die Lebern an Größe zunahmen, bis sie die Größe einer humanen Leber erreicht hatten³⁴. Aber auch im Fall eines Zellüberschusses wird die Ausgangsgröße wiederhergestellt. Ein Überschuss entsteht z.B. bei einer Wirkstoff-induzierten Hyperplasie und/oder Hypertrophie oder bei der Transplantation einer großen Leber in einen kleinen Empfänger („large for size“ transplant). Sowohl in Tierversuchen an Hunden³⁵ als auch bei Lebertransplantationen am Menschen³⁶ konnte nachgewiesen werden, dass sich nach der Transplantation einer Leber, die „zu groß“ für den jeweiligen Empfänger ist, die Lebermasse reduziert, bis die Größe der Leber an die neue Körpergröße angepasst ist.

Diese Studien belegen, dass in gesunden Säugetieren das Verhältnis zwischen Lebermasse und Größe des Gesamtorganismus festgelegt ist. Die Regeneration ist dabei proportional zur Abweichung von dieser Größe. Bereits nach kleinen Verände-

rungen (<10%) erfolgt eine regenerative Antwort und damit die Wiederherstellung der Ausgangsgröße³⁷.

1.2.1 Leberregeneration durch hepatische Vorläuferzellen

Im Normalfall wird der Zellersatz in der Leber nicht durch einen kleinen Pool von Vorläufer- oder Stammzellen gewährleistet, sondern die Regeneration erfolgt durch die Proliferation von parenchymalen und nichtparenchymalen Zellen. Jedoch kann die Regeneration der Leber auch dann ablaufen, wenn die Proliferation der Hepatozyten durch das Einwirken von Toxinen oder durch krankhafte Veränderungen des Lebergewebes ganz oder teilweise gestört ist.

Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, in denen durch die Gabe von Toxinen, wie z.B. Tetrachlorkohlenstoff³⁸, 2-Acetylaminofluoren³⁹ oder Allylalkohol⁴⁰, evtl. in Kombination mit einer partiellen Hepatektomie⁴¹, ein Verlust von Lebermasse und ein gleichzeitiges Blockieren der Hepatozytenproliferation bewirkt wurde. In allen Fällen konnte im Bereich des Periportaltraktes die Proliferation von kleinen Zellen beobachtet werden, die in gallengangsähnlichen Strukturen mit nur undeutlich abgegrenztem Lumen in das umliegende Gewebe einwanderten⁴² und dort zu Hepatozyten und Gallengangszellen differenzierten^{43,44}. Die Zellen waren sehr klein, mit einem Durchmesser von ca. 10 µm, enthielten nur sehr wenig Cytoplasma und besaßen einen ovalen Nukleus, weswegen sie als „oval cells“ bezeichnet wurden⁴⁵.

Auch beim Menschen sind eine Reihe von Krankheiten bekannt, bei denen die Proliferationskapazität und Funktion der Hepatozyten zerstört wird und daher die Regeneration der Leber über einen derartigen Ersatzmechanismus ablaufen muß. Beispiele für derartige Krankheiten sind die Haemochromatose⁴⁶, das Alkohollebersyndrom (ALD)⁴⁷, die nichtalkoholische Fettleber (NAFLD)⁴⁸, die chronische virale Hepatitis B und C⁴⁹, die primär biliäre Zirrhose (PBC), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC)⁵⁰ und die massive hepatische Nekrose⁵¹.

Mittlerweile wird es als erwiesen angesehen, dass die oval cells im Bereich der Hering-Kanälchen lokalisiert sind^{52,53}. Mit Hering-Kanälchen wird die Verbindung zwischen den letzten Ausläufern des Gallenganges (begrenzt durch Cholangiozyten)

und den Gallenkanälchen (gebildet aus zwei benachbarten Leberzellbalken) bezeichnet. Sie befinden sich im Bereich des Periportalfeldes und werden sowohl von Cholangiozyten als auch von Hepatozyten umrahmt⁵⁴.

Unter dem Begriff „oval cells“ verbirgt sich ein heterogenes Zellkompartiment, das Zellen enthält, die sich sowohl in ihrer Differenzierungskapazität als auch in ihrem Differenzierungsgrad unterscheiden⁵⁵. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an humanem Gewebe von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen⁵⁶, fokaler nodulärer Hyperplasie⁵⁷ und extrahepatischer Gallengangsatresie⁵⁸ ergaben eine Einteilung des Kompartiments in drei Zellpopulationen aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika und ihrer Lage.

Typ I Zellen bilden die Gruppe der am wenigsten differenzierten Zellen. Ihr Durchmesser liegt im Bereich von 7-10 µm. Sie befinden sich auf der sinusoidalen Seite der Hepatozyten, bilden Verbindungen mit benachbarten Zellen und enthalten Bündel von Tonofilamenten.

Typ II Zellen sind in der Nachbarschaft der kleinen Ausläufer der Gallengänge zu finden. Zusätzlich zu den Charakteristika der Typ I Zellen sind cholangiozytäre Strukturen erkennbar, nämlich laterale Einstülpungen, apikale Microvilli, basal gelegene pinozytotische Vesikel und eine gut ausgebildete Basalmembran.

Typ III Zellen befinden sich in der Nähe von Hepatozyten, mit denen sie Gallenkanälchen bilden. Sie sind etwas größer als die Typ I und Typ II Zellen (Durchmesser ca. 10-15 µm), enthalten mehr Zytoplasma, eine größere Anzahl an Organellen und Glycogen-Rosetten.

Immunhistochemische Färbungen ergaben, dass in den oval cells sowohl Marker für (unreife) Hepatozyten, wie z.B. AFP, als auch gallengangsspezifische Marker, wie z.B. die Cytokeratine CK7, CK18 und CK19 exprimiert werden^{59,60}. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnten isolierte oval cells zu Hepatozyten und Gallengangszellen ausdifferenziert werden^{61,62}. Bei den oval cells handelt es sich also um ein Kompartiment leberresidenter Vorläuferzellen⁶³. Ihre Rekrutierung aus dem Bereich der Hering-schen Kanäle entspricht gewissermaßen einer Umkehr der Vorgänge im Laufe der Embryonalentwicklung der Leber⁶⁴. Da die hepatischen Vorläuferzellen im Menschen sowohl in ihrer Morphologie als auch in ihrem immunhistochemischen Phänotyp mit den in den Tiermodellen gefundenen Charakteristika übereinstimmen, wird die Bezeichnung „oval cell“ auch im humanen System parallel zu den Begriffen „hepatische Vorläuferzelle“ und „hepatische Stammzelle“ verwendet⁶⁵.

1.2.2 Leberregeneration durch hematopoietische Stammzellen

Neben der Regeneration der Leber durch leberresidente hepatische Vorläuferzellen im Falle einer Schädigung der Hepatozyten wurden in den letzten Jahren weitere mögliche Mechanismen diskutiert. Es gab vermehrt Hinweise darauf, dass auch adulte Stammzellen beim Zellersatz nicht alleine auf die Zellen eines Keimblattes beschränkt sind, sondern ebenso in der Lage sind, auch zu Zellen aus anderen Keimblättern zu „transdifferenzieren“^{66,67}, eine Fähigkeit, die bis dahin lediglich den embryonalen Stammzellen zugeschrieben wurde.

Da in den oval cells neben hepatischen Markern auch eine Reihe von hematopoietischen Markern, wie CD34, CD90 (Thy-1) und CD117 (*c-kit*)^{68,69}, exprimiert werden, ging man vermehrt der Frage nach, ob Zellen aus dem hematopoietischen System in der Lage sind, zur Leberregeneration beizutragen.

Die Fähigkeit von hematopoietischen Stammzellen, in die Leber zu integrieren und zu Hepatozyten auszudifferenzieren, wurde *in vivo* bereits mehrfach im Tiermodell gezeigt^{70,71}. Dieses Phänomen kann auch beim Menschen nachgewiesen werden. Sowohl in Lebern von weiblichen Patienten, die Knochenmarksspenden von einem männlichen Spender erhalten hatten, als auch in Leberexplantaten aus männlichen Patienten, denen diese Leber von einer weiblichen Spenderin transplantiert worden war, wurden Hepatozyten mit Y-Chromosomen gefunden, die offensichtlich aus dem Knochenmark in die Leber eingewandert und dort differenziert waren^{72,73}. In verschiedenen *in vitro* Versuchen mit Knochenmarkszellen aus Nagetieren^{74,75} und humanen^{76,77} Knochenmarkszellen konnte diese Hypothese bestätigt werden.

Nach derzeitigem Verständnis läuft die Regeneration der Leber in einer Art dreischichtigem Prozess ab⁷⁸. Primär können reife Hepatozyten und Cholangiozyten proliferieren, ein Vorgang, der für den Großteil des erforderlichen Zellersatzes ausreichend ist. Zweitens können unreife Zellen aus dem Bereich der Heringschen Kanäle bei mäßigen bis starken Schäden zu Hepatozyten und Cholangiozyten differenzieren. Und drittens können Zellen aus dem Knochenmark in die Leber einwandern, wo sie bei geringfügigen Schädigungen vereinzelte Hepatozyten und Cholangiozyten erzeugen.

2 Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, in der humanen Leber eine Zellpopulation zu identifizieren und zu isolieren, die eine mögliche Vorläuferpopulation der Leber darstellen könnte.

Zunächst sollte ein geeignetes Markerpanel zusammengestellt werden, das sowohl hepatische Marker, als auch Vorläufermarker, die auf Vorläuferzellen der Leber vermutet werden, beinhalten sollte. Damit sollten an Gewebeschnitten aus humaner Leber die einzelnen Zelltypen der Leber identifiziert werden und eine Lokalisation von Zellen mit Vorläufermarkern erfolgen.

Da hepatische Vorläuferzellen aufgrund ihrer Größe und Dichte eine Subpopulation der nichtparenchymalen Zellen bilden, sollte ein Protokoll entwickelt werden, mit dem in möglichst standardisierter Weise Fraktionen an nichtparenchymalen Zellen aus humanen Leberzellresektaten isoliert werden können.

Über eine Beurteilung der Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen und der Zusammensetzung der erhaltenen Zellfraktionen sollte die Qualität des entwickelten Protokolles und die Eignung der erhaltenen Zellfraktion als Ausgangsmaterial für die Isolation von Vorläuferzellen überprüft werden.

Mit den aus der Charakterisierung erhaltenen Aussagen über die Zusammensetzung der nichtparenchymalen Fraktion an Zellen mit Vorläufermarkern sollte ein geeigneter Oberflächenmarker ausgewählt werden, über den mit Hilfe einer immunmagnetischen Isolation eine weitere Aufreinigung erfolgen kann.

Durch eine genaue Charakterisierung der isolierten Zellpopulation bezüglich der Expression von weiteren Vorläufermarkern und von hepatischen Differenzierungsmarkern sollte überprüft werden, ob es sich bei der gewonnene Zellpopulation um eine Vorläuferpopulation handeln könnte.

Für die Charakterisierung *in vitro* sollte zudem ein geeignetes Kulturmodell etabliert werden, in dem die gewonnenen Zellen in möglichst undifferenzierter Weise kultiviert und expandiert werden können bzw. mit dem eine Differenzierung der Zellen zu Cholangiozyten bzw. Hepatozyten erreicht werden kann.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von möglichen Vorläuferzellpopulationen in humanem Lebergewebe

Für die spätere Identifizierung der einzelnen Leberzelltypen und die Charakterisierung der bei den verschiedenen Isolationsschritten erhaltenen Leberzellfraktionen wurde zunächst ein geeignetes Markerpanel aus hepatozytären und cholangiozytären Markern zusammengestellt (s. Tab. 1).

Tab. 1: Liste der verwendeten hepatischen Marker zur Färbung von Gewebeschnitten

Antikörper	Zielzellen	Referenz
Albumin	Hepatozyten	79,80
HepPar1	Hepatozyten	81,82
CK18	Hepatozyten / Cholangiozyten	83,84
CK19	Cholangiozyten	85,86
HEA125	Cholangiozyten	87,88
CK7	Cholangiozyten	89,90
CD31	Endothelzellen	91,92
CD68	Kupffer Zellen	93,94,95
SMA- α	Ito-Zellen	96,97,98

Zur Überprüfung der Spezifität der gewählten Marker und zur Ermittlung der geeigneten Antikörper-Konzentrationen wurden APAAP-Färbungen an 6 μm Gewebeschnitten durchgeführt (s. Abb. 2).

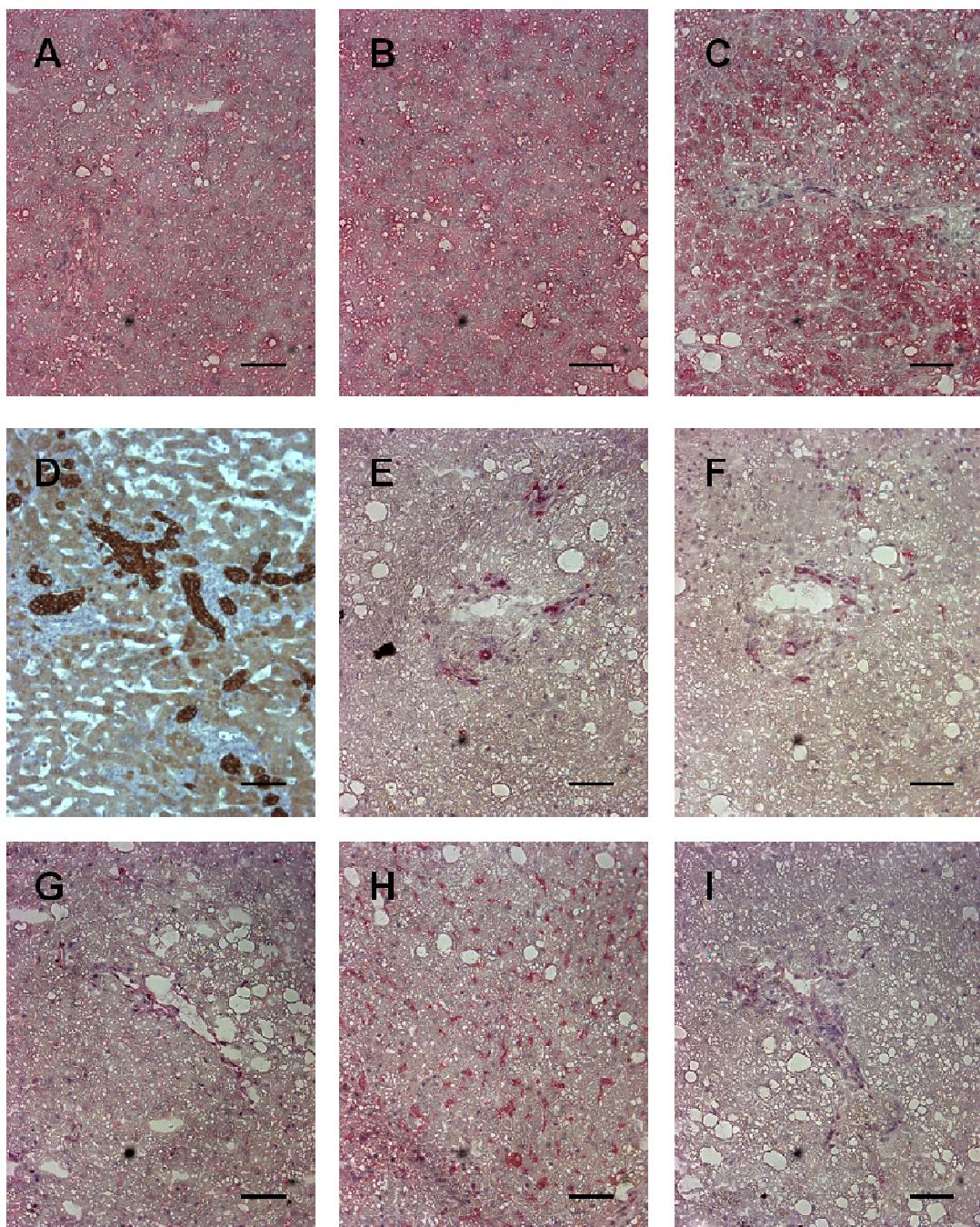


Abb. 2: Immunhistochemische Färbung von 6 µm Gewebeschnitten mit hepatischen Markern

Mit **A)** Albumin und **B)** HepPar-1 wurden die Hepatozyten angefärbt, während **C)** CK18 zusätzlich auf Gallengangszellen zu finden war. Die Färbungen mit **D)** CK7, **E)** CK19 und **F)** HEA125 dienten dem Nachweis von Gallengangszellen. Mit **G)** CD31 konnten die Endothelzellen der Blutgefäße angefärbt werden, während **H)** CD68 auf den innerhalb des Parenchyms verstreuten Kupffer-Zellen gefunden wurde. Mit **I)** SMA- α konnten Ito-Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Die Färbungen mit Ausnahme von **D)** wurden an Gewebe durchgeführt, das in OCT compound eingebettet war, und nach der APAAP-Methode angefärbt. Die Balken geben jeweils eine Größe von 200 µm an. Die Färbung auf CK7 wurde am Institut für Pathologie des Uniklinikums Regensburg an Paraffin-eingebettetem Gewebe durchgeführt. Der Balken gibt hierbei eine Größe von 100 µm an.

Albumin (s. Abb. 2A) und HepPar1 (s. Abb. 2B) sind Marker für Hepatozyten. Erkennbar war jeweils eine gleichmäßige Färbung des Parenchyms, während Gallengangsstrukturen innerhalb des Parenchyms und die Bereiche der Portalfelder nicht angefärbt wurden.

Mit CK18 (s. Abb. 2C) wurden ebenso wie mit Albumin und HepPar1 die Hepatozyten gefärbt. Zusätzlich erfolgte eine Färbung der Gallengangszellen, die innerhalb der Portalfelder besonders gut zu erkennen war.

Die Färbungen mit CK7 (s. Abb. 2D), CK19 (s. Abb. 2E) und HEA125 (s. Abb. 2F) waren praktisch identisch. In allen Färbungen wurden die Gallengänge der Portalfelder und die Gallengangsstrukturen innerhalb des Parenchyms angefärbt.

Mit CD31 (s. Abb. 2G) erfolgte eine Färbung der kleineren und größeren Blutgefäße, die innerhalb des Parenchyms und in den Portalfeldern verlaufen.

Der Makrophagen-Marker CD68 (s. Abb. 2H) ist in der Leber zum Nachweis von Kupffer-Zellen geeignet. Die Färbungen zeigten sternförmige oder langgezogene Zellen, die entlang der Sinusoide verlaufen.

Mit SMA- α (s. Abb. 2I) können Ito-Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Besonders gut erkennbar war diese Färbung in den Portalfeldern.

Tab. 2: Liste der verwendeten Vorläufermarker zur Färbung von Gewebeschnitten

Antikörper	Zielzellen	Referenz
CD34	Endothelzellen Hematopoietische Vorläuferzellen Hepatische Vorläuferzellen	99,100
CD90 (Thy-1)	Hematopoietischen Vorläuferzellen Hepatische Vorläuferzellen	101,102
CD117 (c-kit)	Hematopoietische Vorläuferzellen Hepatische Vorläuferzellen	103,104
OV6	Hepatozyten / Cholangiozyten Hepatische Vorläuferzellen	105,106
CK14	Hepatische Vorläuferzellen	107,108
M2-PK	Fetale Hepatozyten Gallengangszellen Hepatische Vorläuferzellen	109,110

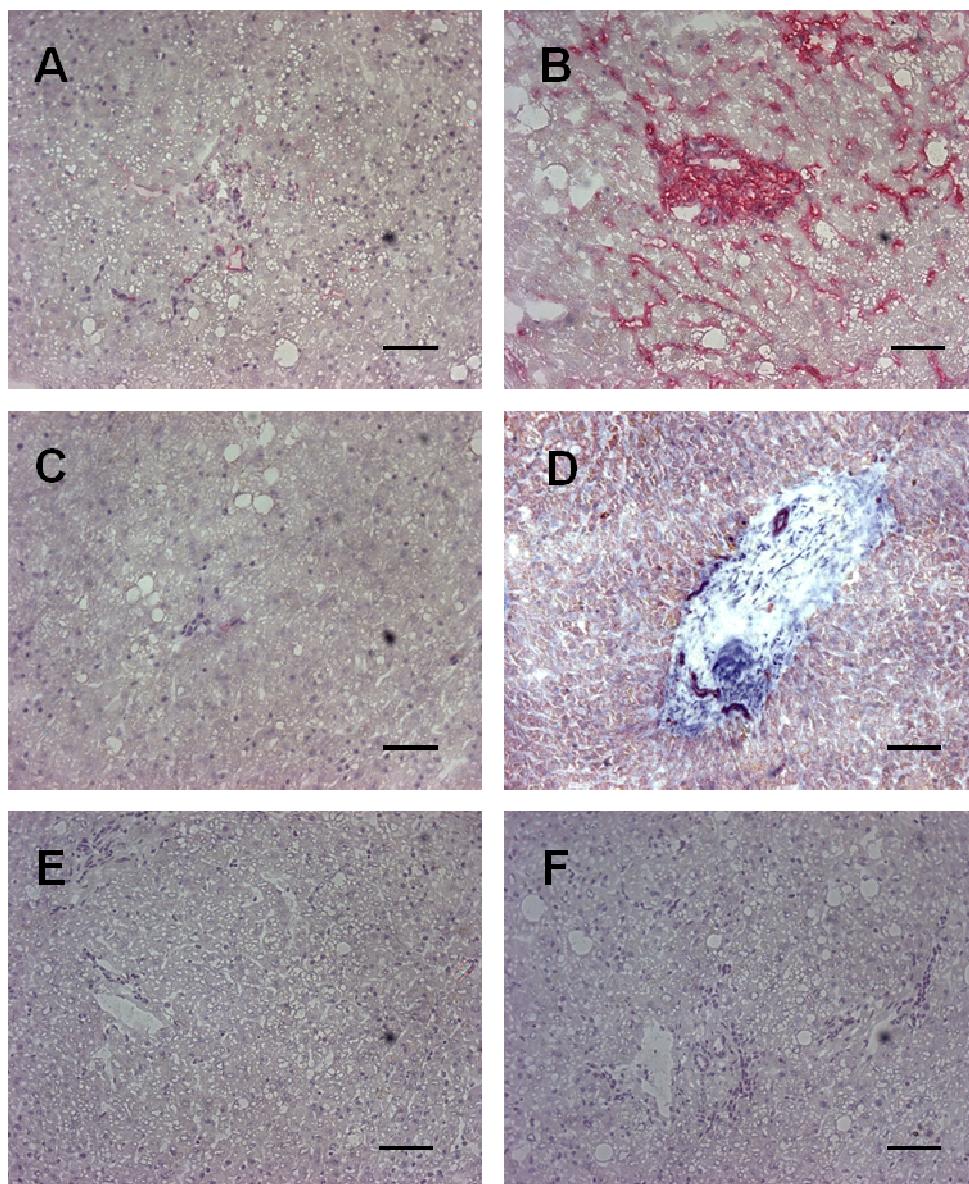


Abb. 3: Immunhistochemische Färbung von 6 µm Gewebeschnitten mit Vorläufermarkern

Mit **A)** CD34 wurden die Endothelzellen der Blutgefäße angefärbt. **B)** CD90 (Thy-1)-positive Zellen fanden sich in den Portalfeldern und in Zellsträngen innerhalb des Parenchyms. Eine positive Färbung für **C)** CD117 (c-kit) konnte nur bei vereinzelten Zellen gefunden werden. **D)** OV-6 zeigte eine Färbung von Gallengangsstrukturen und von Parenchymzellen in der Umgebung der Portalfelder. Weder mit **E)** CK14 noch **F)** M2-PK konnten im Gewebschnitt Zellen nachgewiesen werden.

Das in OCT compound eingebettete Gewebe wurde nach der APAAP-Methode angefärbt. Die Balken geben jeweils eine Größe von 200 µm an.

Für die Identifizierung von möglichen Vorläuferpopulationen in der humanen Leber wurde ebenfalls ein geeignetes Markerpanel aus hematopoietischen und hepatischen Vorläufermarkern erstellt und anhand von Färbungen an 6 µm Gefrierschnitten überprüft (s. Tab. 2).

Mit der Färbung auf CD34 (s. Abb. 3A) konnten ebenso wie mit der Färbung auf CD31 (s. Abb. 2G) die Endothelzellen der verschiedenen Blutgefäße nachgewiesen werden. CD90 (s. Abb. 3B) zeigte eine sehr intensive Färbung, vor allem innerhalb der Portalfelder, wo jedoch vermutlich auch Zellen des Bindegewebes angefärbt wurden. Zusätzlich wurden Zellstränge innerhalb des Parenchysms angefärbt. Mit CD117 (s. Abb. 3C) konnten bei den durchgeföhrten Färbungen nur selten vereinzelte Zellen nachgewiesen werden. OV6 (s. Abb. 3D) färbte sowohl Gallengangszellen in den Portalfeldern und innerhalb des Parenchysms als auch Hepatozyten an.

Bei den Färbungen für CK14 (s. Abb. 3E) und M2-PK (s. Abb. 3F) konnten an den untersuchten Schnitten keine positiven Zellen nachgewiesen werden.

3.2 Isolation von nichtparenchymalen Zellfraktionen

Als Ausgangsfraktion für die Isolation von möglichen Vorläuferzellpopulationen sollten nichtparenchymale Zellfraktionen eingesetzt werden. Für die Isolation dieser Zellen aus humanem Lebergewebe wurden chirurgische Leberzellresektate verwendet.

Im ersten Schritt der Aufarbeitung erfolgte die Isolation von Hepatozyten nach einer modifizierten EGTA/Collagenase Perfusion. Das verbleibende Restgewebe wurde kleingeschnitten und mit einer Enzymlösung aus Collagenase, Pronase und DNase verdaut. Zur weiteren Anreicherung der nichtparenchymalen Zellfraktion wurde die nach der Filtration und mehreren Waschschritten erhaltene Gesamtzellssuspension über einen Percoll-Gradienten aufgereinigt (s. Abb. 4). Aus diesem Reinigungsschritt ergaben sich vier Zellfraktionen: Überstand (wässrige Phase), Zwischenschicht zwischen Percoll-Phase und wässriger Phase, Percoll-Faktion und Pellet. Die Anzahl und der Größenbereich der Zellen in den einzelnen Zwischenfraktionen der Aufreinigung wurden am Casy® Cell Counter ermittelt (s. Abb. 5). Außerdem erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Zellen und die Bestimmung der Vitalität durch den

Ausschluss von Trypanblau. Vom Überstand und von der Zwischenschicht des Percoll-Gradienten wurden Zellen pelletiert und immunhistochemisch untersucht.

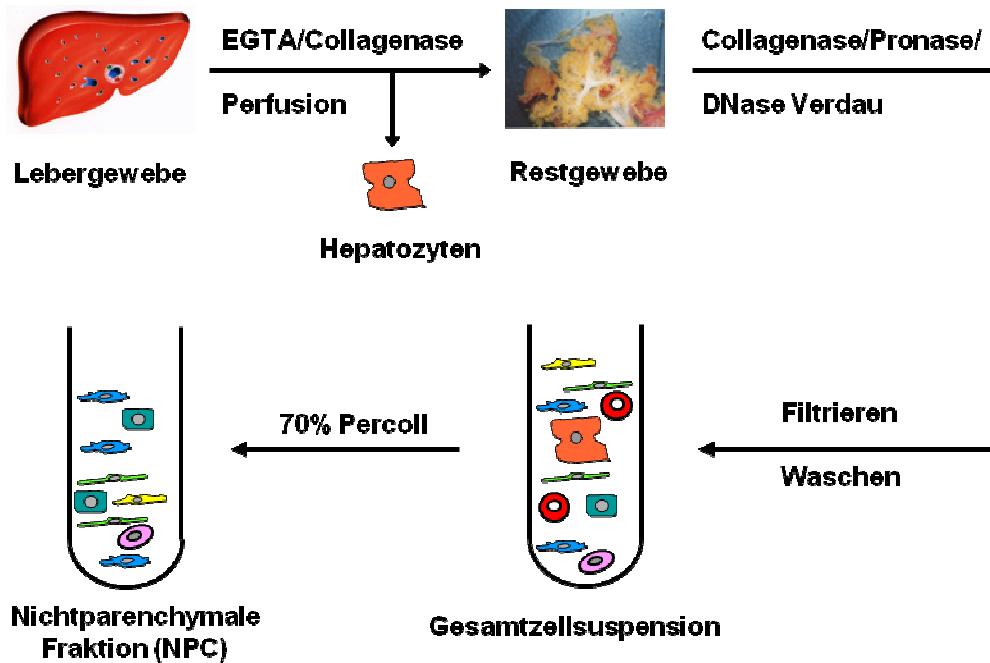


Abb. 4: Schema zur Isolation von Zellen aus humanen Leberresektaten

Die Isolation von Zellen aus humanem Lebergewebe erfolgte durch eine EGTA/Collagenase-Perfusion von humanen Leberresektaten zur Gewinnung von Hepatozyten und dem anschließenden Verdau des zerkleinerten Restgewebes mit Collagenase/Pronase/DNase. Durch die Zentrifugation über einen 70% Percoll-Gradienten wurde die nichtparenchymale Zellfraktion von den übrigen in der Gesamtzelluspension vorhandenen Zellen abgetrennt.

Der Überstand der Percoll-Reinigung (s. Abb. 5 B) enthielt Zelldebris, Zellaggregate aus meist toten Zellen und Agglomerate aus Bindegewebe und Fett. Daneben fanden sich viele Zellen im Größenbereich von 10-20 µm. Dabei handelte es sich zum größten Teil um Hepatozyten, die im Zellpellet mit CK18 angefärbt werden konnten (s. Abb. 6 A). In der Percoll-Fraktion (s. Abb. 5 C) befanden sich nur sehr wenige, meist vitale Zellen, die aufgrund der geringen Anzahl aber nicht weiter charakterisiert wurden. Das Pellet der Percoll-Aufreinigung (s. Abb. 5 D) bestand hauptsächlich aus Erythrozyten. In der Zwischenschicht zwischen der wässrigen Phase und der Percoll-Fraktion zeigte sich eine deutliche Anreicherung an vitalen Zellen im Größenbereich von 5-15 µm und vereinzelten Zellaggregaten aus ebenfalls vitalen Zellen.

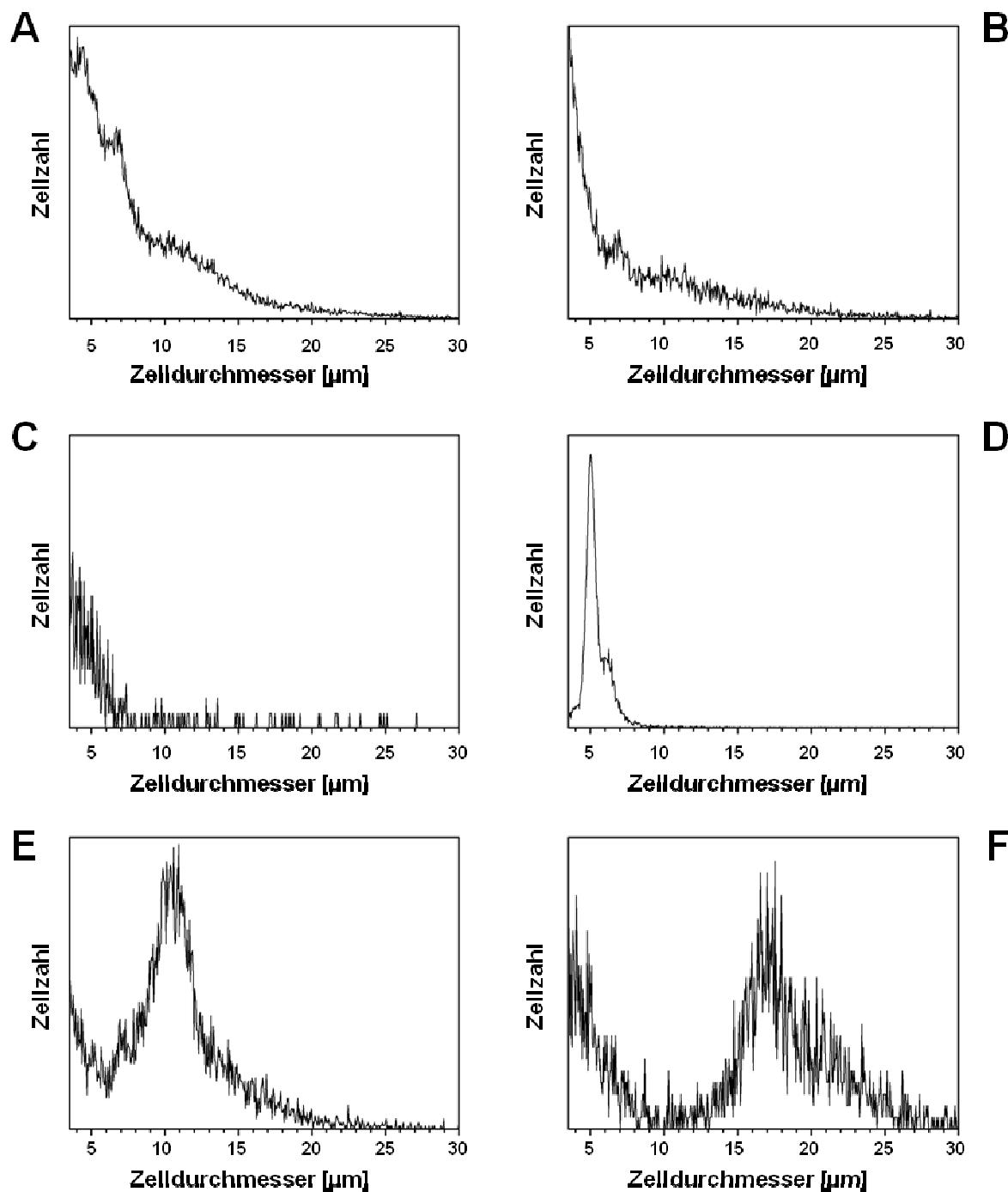


Abb. 5: Reinigungsschritte der Isolation von Leberzellen aus Leberzellresektaten

A) Leberzellsuspension, B) Überstand Percoll-Gradient, C) Percoll-Fraktion, D) Pellet Percoll-Gradient, E) Zwischenschicht Percoll (NPC-Fraktion) und F) Hepatozyten-Fraktion

Durch die Aufreinigung der Leberzellsuspension über einen Percoll-Gradienten konnte in der Zwischenschicht (E) eine deutliche Anreicherung an Zellen mit einem Zelldurchmesser von 5-15 µm erreicht werden, ein Wert, der mit dem in der Literatur angegebenen Größenbereich für nichtparenchymale Zellen übereinstimmt. Die so isolierte Zellfraktion unterscheidet sich in der Größenverteilung der Zellen deutlich von einer gereinigten Hepatozyten-Fraktion (F), die Zellen im Bereich von 15-25 µm enthält.

Die immunhistochemische Färbung mit Markern für nichtparenchymale Zellen zeigte deutliche Populationen an CD68- und HEA125- positiven Zellen in dieser Fraktion (s. Abb. 6 B und 6 C).

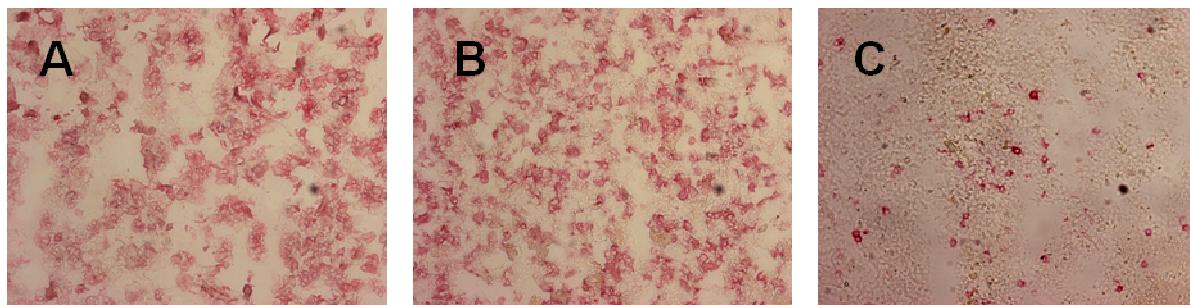


Abb. 6: Immunhistochemische Färbung der Percoll-Fraktionen

APAAP-Färbungen von Zellpellets aus **A)** Überstand, Färbung mit dem Hepatozyten-Marker CK18. **B)** Zwischenschicht der Percoll-Aufreinigung, Färbung mit dem nichtparenchymalen Marker CD68 (Kupffer-Zellen). **C)** Zwischenschicht der Percoll-Aufreinigung von Leberzellsuspensionen, Färbung mit dem nichtparenchymalen Marker HEA125 (Cholangiozyten). Während im Überstand die verbliebenen Hepatozyten abgetrennt wurden, konnte in der Zwischenschicht des Percoll-Gradienten durch immunhistochemische Färbungen eine deutliche Anreicherung an nichtparenchymalen Zellen nachgewiesen werden.

3.3 Charakterisierung der nichtparenchymalen Zellfraktion

3.3.1 Ausbeute und Vitalität

Die Isolation von nichtparenchymalen Zellen wurde mit insgesamt 65 Leberzellresektaten durchgeführt. Davon stammten 48 von männlichen Patienten, 17 von weiblichen. Das Alter der Patienten lag zwischen 11 und 86 Jahren. Das Gewicht der aufgearbeiteten Resektate lag im Bereich von 13,4–290 g, wobei der Hauptteil ($n=47$) allerdings im Bereich von 20 – 70 g lag (s. Abb. 7). Die Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen wurde durch eine Bestimmung der Zellzahl am Casy® Cell Counter ermittelt und betrug $2,7 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ /g Resektatgewebe (s. Abb. 8). Die Vitalität der isolierten Zellen (ermittelt durch die durchflusszytometrische Messung von PI-gefärbten Zellen, $n=19$) lag bei $82,9\% \pm 9,2\%$ (s. Abb. 9).

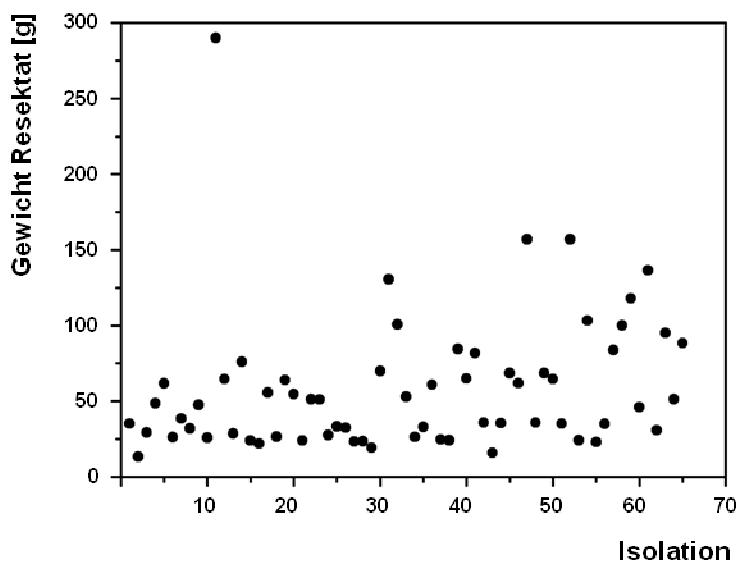


Abb. 7: Gewicht der aufgearbeiteten Leberzellresektate

Das Gewicht der aufgearbeiteten Resektate erstreckte sich über einen relativ großen Bereich, die meisten Resektate besaßen allerdings ein Gewicht im Bereich von 20 – 70 g.

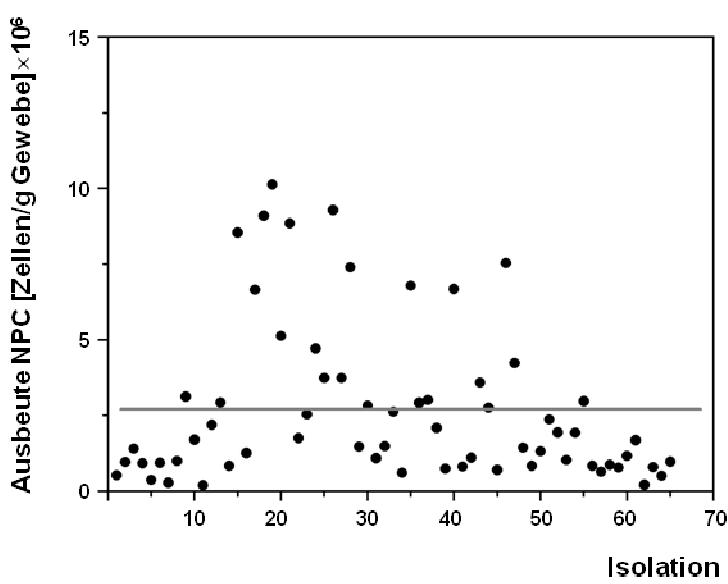


Abb. 8: Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen aus Leberzellresektaten

Die Isolation von nichtparenchymalen Zellen wurde an 65 Leberzellresektaten durchgeführt. Dabei ergab sich eine durchschnittliche Zellausbeute von $2,7 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ /g Resektatgewebe.

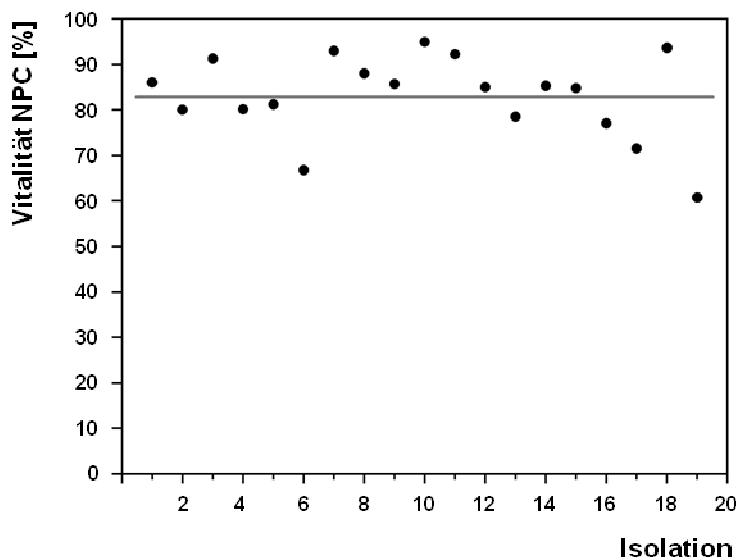


Abb. 9: Vitalität von isolierten nichtparenchymalen Zellen

Die Vitalität der nichtparenchymalen Zellfraktion wurde durch die durchflusszytometrische Messung von PI-gefärbten Zellen ermittelt. Bei insgesamt 19 durchgeföhrten Bestimmungen ergab sich eine Vitalität von $82,9\% \pm 9,2\%$.

3.3.2 Korrelation der Ausbeute mit der Histologie des Gewebes

Mit Hilfe der feingeweblichen Beurteilung des Resektatgewebes aus den histologischen Gutachten des Institutes für Pathologie der Uniklinik Regensburg wurde untersucht, ob die Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen vom Zustand des aufgearbeiteten Gewebes, also von verschiedenen krankhaften Veränderungen des Ausgangsgewebes abhängt oder nicht. Untersucht wurden dabei die Auswirkungen von Cholestase, Fibrose, Zirrhose, Entzündung und Verfettung des Gewebes. Dabei wurde in jeder dieser Gruppen lediglich berücksichtigt, ob die jeweilige Erkrankung vorhanden war oder nicht. Eine weitere Einteilung unter Berücksichtigung der Schwere der Erkrankungen konnte aufgrund der zu geringen Anzahl an Isolationen nicht vorgenommen werden. Beim Vergleich der Zellausbeuten aus erkranktem und nichterkranktem Gewebe zeigte sich, dass bei keiner dieser Erkrankungen eine signifikante Veränderung der Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen festgestellt werden konnte. (s. Abb. 10).

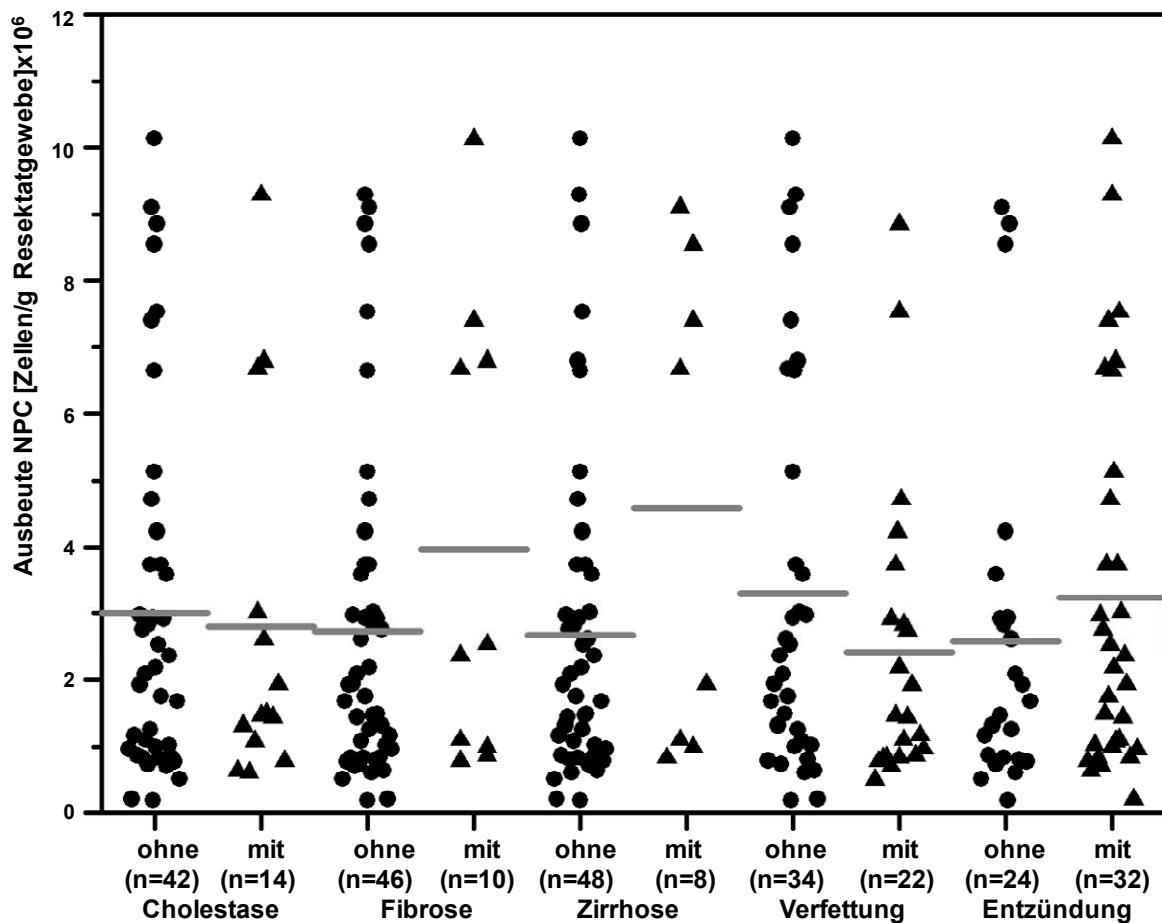


Abb. 10: Abhängigkeit der Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen von verschiedenen Erkrankungen des Lebergewebes

Während aus nicht-cholestaticischem Lebergewebe $3,00 \pm 2,73 \times 10^6$ NPC/g isoliert werden konnten, betrug die Ausbeute aus cholestaticischem Gewebe $2,80 \pm 2,74 \times 10^6$ Zellen/g ($p=0,80850$). Aus nicht-fibrotischem Gewebe wurden $2,73 \pm 2,52 \times 10^6$ NPC/g isoliert, aus fibrotischem Gewebe $3,97 \pm 3,44 \times 10^6$ NPC/g ($p=0,19394$). Aus Gewebe ohne Zirrhose konnten $2,68 \pm 2,46 \times 10^6$ NPC/g isoliert werden, aus zirrhotischem Gewebe $4,58 \pm 3,67 \times 10^6$ NPC/g ($p=0,6680$). Die Ausbeute bei nicht-verfettetem Gewebe betrug $3,30 \pm 2,96 \times 10^6$ NPC/g, aus verfettetem Gewebe $2,42 \pm 2,24 \times 10^6$ Zellen/g ($p=0,23992$). Aus nicht-entzündetem Gewebe wurden $2,58 \pm 2,63 \times 10^6$ Zellen/g isoliert, aus entzündetem Gewebe $3,23 \pm 2,78 \times 10^6$ Zellen/g ($p=0,37557$).

Bei keiner dieser Erkrankungen konnte also eine signifikante Veränderung der Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen festgestellt werden.

3.3.3 Expression von Oberflächenmarkern

Bisher erfolgte Studien zum Nachweis möglicher Vorläuferzellpopulationen in der Leber beschreiben neben verschiedenen hepatischen Markern auch das Vorhandensein einer Reihe von hematopoietischen Oberflächenmarkern auf solchen Zellen¹¹¹. Besonders hervorzuheben sind hier CD34, CD90 (Thy-1) und CD117 (c-kit). Um zu bestimmen, welchen Anteil solche Zellen neben den Zellfraktionen mit hepatischen Markern in der aus dem Gewebeverdau erhaltenen nichtparenchymalen Fraktion haben, wurden die Zellen mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Bestimmung der Vitalität der Zellen erfolgte dabei über den Ausschluss von Propidiumiodid.

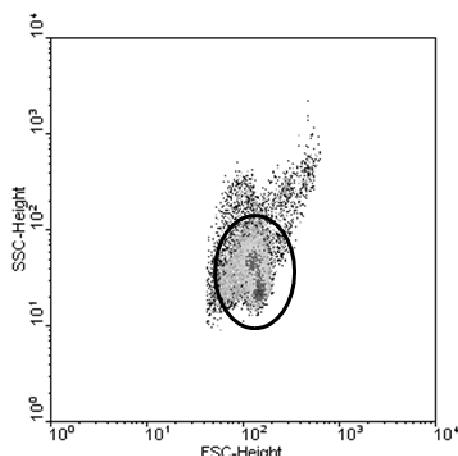


Abb. 11: Forward Scatter(FSC)/Side Scatter (SSC) Diagramm von NPC-Fraktionen

Die FSC/SSC-Diagramme der nichtparenchymalen Zellfraktionen zeigten jeweils eine Hauptpopulation in einem relativ engen Größenbereich mit nur geringen Verunreinigungen durch kleinere oder größere Zellen. Die Population selbst war heterogen bezüglich ihrer Granularität. Erkennbar waren zwei ineinander übergehende Unterpopulationen mit höherer und niedrigerer Granularität.

Abb. 11 zeigt ein typisches Forward/Side Scatter Diagramm einer durchflusszytometrischen Messung von nichtparenchymalen Zellen. Der Hauptanteil der vorhandenen Zellen bildete eine Population in einem relativ engen Größenbereich, es lagen also keine oder nur geringe Verunreinigungen durch größere Zellen (Hepatozyten) oder kleinere Zellen (Erythrozyten) vor. Die Population war leicht heterogen bezüglich der Granularität der Zellen. Erkennbar waren zwei nicht deutlich voneinander getrennte Untergruppen aus Zellen mit geringer und etwas höherer Granularität.

Tab. 3: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Färbung von nichtparenchymalen Zellfraktionen

Marker	Anteil [% NPC]	n
CD31	$13,3 \pm 7,0$	7
HEA125	$4,8 \pm 4,2$	15
CD34	$6,1 \pm 4,4$	18
CD45	$65,0 \pm 26,5$	23
CD90	$9,6 \pm 6,1$	22
CD117	$8,2 \pm 7,0$	18

In Tab. 3 sind die Anteile der einzelnen untersuchten Subpopulationen an der Gesamtfraktion zusammengefasst. Mehr als 60% der Zellen exprimierten CD45. Die Ausbeute für Endothelzellen (CD31) lag bei $13,3\% \pm 7,0\%$, während $4,8\% \pm 4,2\%$ der isolierten Zellen positiv für den Gallengangsmarker HEA125 waren. Die Anteile von CD34-, CD90- und CD117-positiven Zellen an der nichtparenchymalen Fraktion lagen bei jeweils unter 10%, wobei die CD90-Fraktion mit $9,6\% \pm 6,1\%$ die größte dieser drei Subpopulationen war.

Die Überschneidung der einzelnen Subpopulationen wurde durch Doppelfärbungen mit verschiedenen Markerkombinationen ermittelt (s. Tab. 4). Dabei zeigte sich, dass sowohl auf Endothelzellen (CD31), als auch auf Gallengangszellen (HEA125) zu einem gewissen Anteil hematopoietische Marker zu finden waren. Etwa 20% der CD31-Zellen exprimierten CD34, während CD45 von ca. 50% der CD31-Zellen exprimiert wurde. Bei den HEA125-Zellen zeigten etwa 30% der Zellen eine Expression von CD34 bzw. CD45, während der Anteil an CD90-positiven Zellen bei dieser Population bei etwa 70% lag.

Tab. 4: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Doppelfärbung von NPC-Faktionen

Markerkombination	Anteil [% NPC]	n
CD34/CD31	$2,1 \pm 2,0$	4
CD34/CD45	$7,6 \pm 10,1$	13
CD34/CD90	$1,6 \pm 1,9$	11
CD34/CD117	$1,7 \pm 1,9$	9
CD34/HEA125	$1,4 \pm 0,9$	3
CD45/CD31	$7,4 \pm 1,9$	3
CD45/CD90	$7,3 \pm 4,1$	11
CD45/CD117	$6,3 \pm 6,9$	13
CD45/HEA125	$1,5 \pm 0$	1
CD90/CD117	$3,4 \pm 0,6$	5
CD90/HEA125	$3,7 \pm 0$	1

Auch bei den hematopoietischen Zellen zeigten sich deutliche Überschneidungen der einzelnen Subpopulationen. In der CD34+-Subpopulation exprimierten $59,5\% \pm 34,5\%$ der Zellen CD90 und $46,7\% \pm 33,9\%$ CD117. In der CD90+ Fraktion konnten bei $14,2\% \pm 11,4\%$ der Zellen eine CD34-Expression nachgewiesen werden, während $81,3\% \pm 6,6\%$ doppelt positiv für CD117 waren. $12,7\% \pm 11,3\%$ der CD117-positiven Population exprimierten zusätzlich CD34 und $82,7\% \pm 16,5\%$ der Zellen CD90. In Abb. 12 sind die Durchflusszytometrie-Diagramme für die Doppelfärbungen der hematopoietischen Marker dargestellt. In allen Färbungen waren die doppelt positiven Zellen als deutlich abgegrenzte Populationen erkennbar.

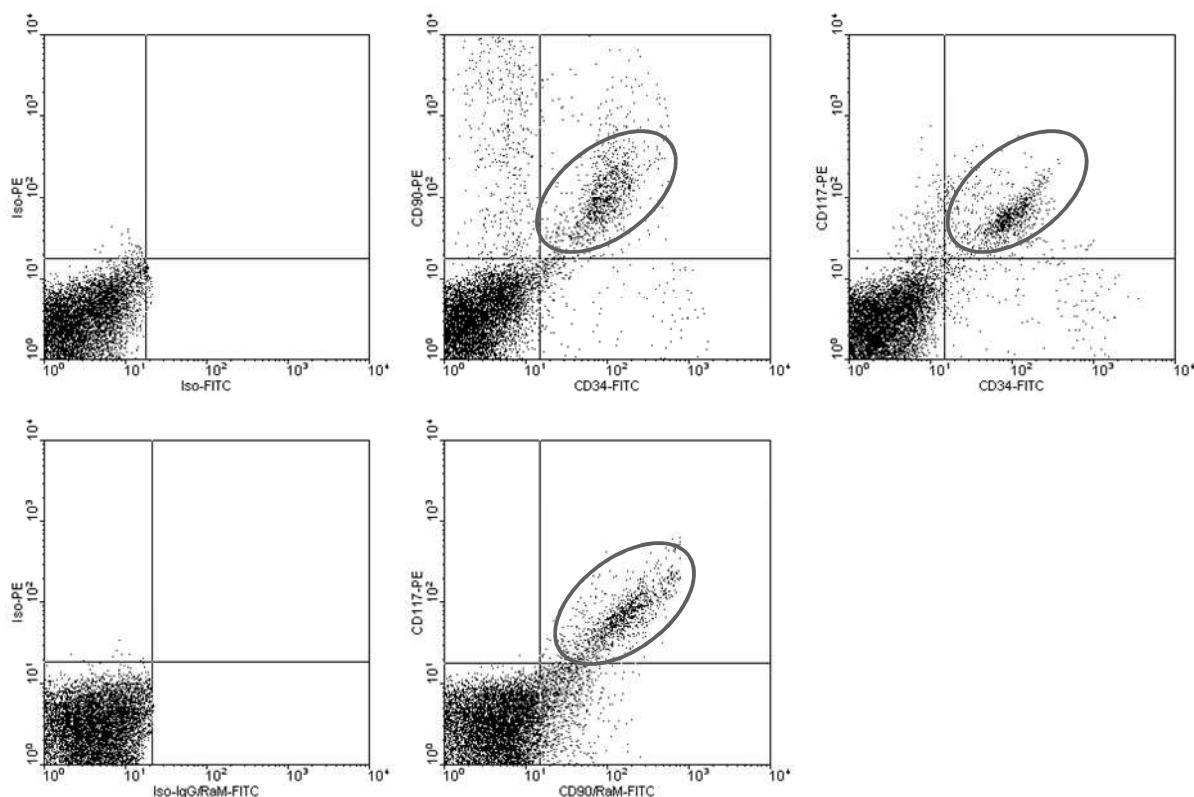


Abb. 12: Durchflusszytometrische Doppelfärbung von nichtparenchymalen Zellfraktionen

Die durchflusszytometrische Färbung von nichtparenchymalen Zellfraktionen mit einer Kombination aus jeweils zwei hematopoietischen Markern zeigte jeweils ausgeprägte Populationen an doppelt positiven Zellen.

Bei der graphischen Darstellung der Doppelfärbungen der einzelnen hematopoietischen Subpopulationen (s. Abb. 13) zeigte sich deutlich, dass die Überschneidung mit den beiden anderen hematopoietischen Markern in der CD90-positiven Subpopulation am größten war. Bei einer Isolation von CD90-positiven Zellen konnte also der größte Anteil an Zellen mit einem der drei untersuchten hematopoietischen Markern isoliert werden.

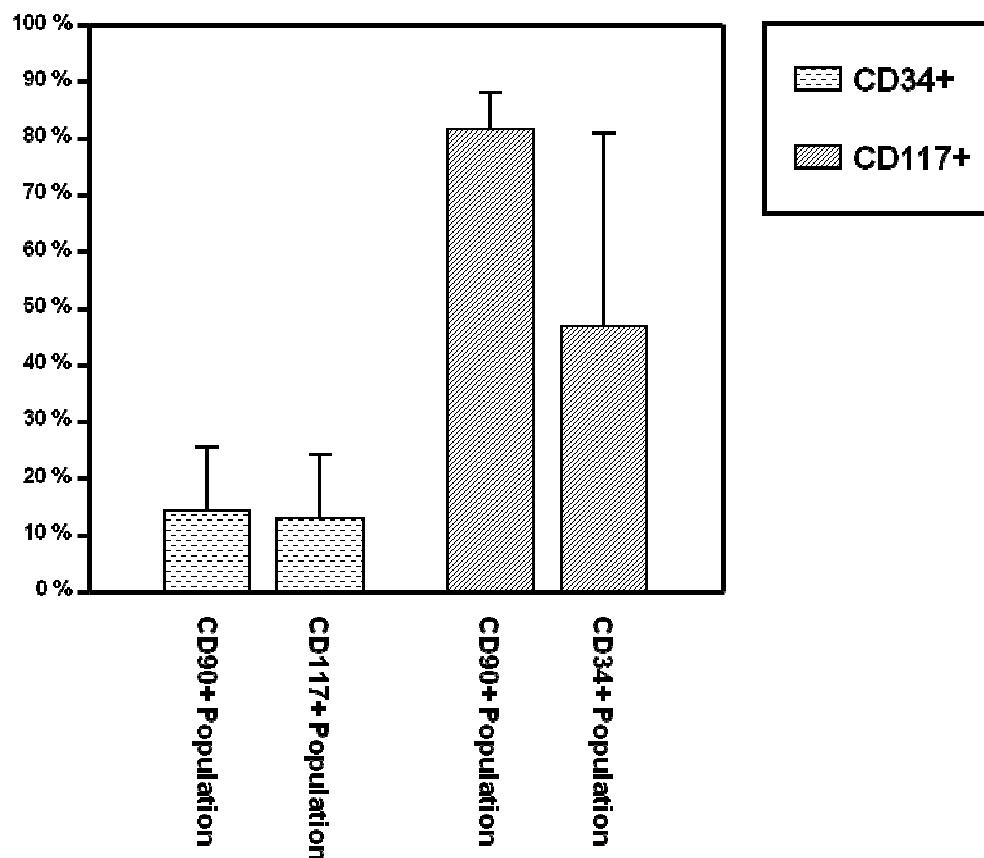


Abb. 13: Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Doppelfärbung von NPC-Fraktionen mit hematopoietischen Markern

Die graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Doppelfärbung von nichtparenchymalen Zellfraktionen zeigte deutlich, dass die Überschneidung mit den beiden anderen untersuchten hematopoietischen Markern in der CD90-Population am größten war.

3.3.4 Hematopoietisches Potential

Da der Anteil an Zellen mit hämatopoietischen Markern in der nichtparenchymalen Fraktion sehr hoch war, sollte überprüft werden, ob diese Zellen noch hematopoietisches Potential besitzen. Dafür wurden CFU-Assays mit den Zellen aus einer nichtparenchymalen Zellfraktion durchgeführt. Die Zellen wurden dafür in verschiedenen Zellkonzentrationen mit speziellem Methylzellulosemedium gemischt und in Petrischalen ausplattiert. Nach einer Kulturzeit von 14 Tagen wurden die entstandenen multilineage hematopoietischen Kolonien ausgezählt. Es wurden 3 ± 2 CFU-E und $18,5 \pm 2,5$ CFU-GM pro $2,5 \times 10^4$ NPC gefunden, während weder BFU-E noch CFU-

GEMM nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich dazu werden bei humanen Knochenmarkszellen 9 ± 4 CFU-E, 38 ± 8 BFU-E, 47 ± 10 CFU-GM und 1 ± 1 GEMM pro 1×10^4 Zellen nachgewiesen, in CD34-angereicherten Populationen sogar 3 ± 3 CFU-E, 28 ± 7 BFU-E, 73 ± 17 CFU-GM und 2 ± 1 GEMM pro 500 Zellen¹¹². Die Zellen der nicht-parenchymalen Zellfraktion aus humaner Leber besitzen also kein hämatopoietisches Potential mehr.

3.4 Isolation von CD90+ Zellen aus NPC-Fraktionen

Die durchflusszytometrische Charakterisierung der nichtparenchymalen Zellfraktionen zeigte, dass durch die Wahl von CD90 als Oberflächenmarker für eine Anreicherung von Vorläuferzellpopulationen die größte Zellpopulation gewonnen werden konnte. Zudem ergaben sich bei den CD90 Zellen die größten Überschneidungen mit den beiden anderen untersuchten hematopoietischen Markern, CD34 und CD117, weswegen dieser Marker für die immunomagnetische Isolation ausgewählt wurde.

Die Isolation von CD90+ Zellen erfolgte aus der aus dem Gewebeverdau erhaltenen nichtparenchymalen Zellfraktion mittels einer immunomagnetischen Markierung der Zielzellen. Zur Standardisierung der Isolation und um auszuschließen, dass Unterschiede in der Ausbeute auf unterschiedliche Zelldichten im Isolationsansatz zurückzuführen waren, war die Ausgangszellzahl stets gleich.

Es wurden insgesamt 39 CD90-Isolationen durchgeführt, wobei 29 dieser Zellpräparationen von männlichen, 10 von weiblichen Spendern stammten. Das Alter der Patienten lag zwischen 11 und 82 Jahren. Die Ausbeute an CD90+ Zellen betrug $6,85 \times 10^5 \pm 4,42 \times 10^5$ Zellen / Isolation, was einem Anteil von $1,45\% \pm 0,86\%$ der NPC-Fraktion entsprach (s. Abb. 14).

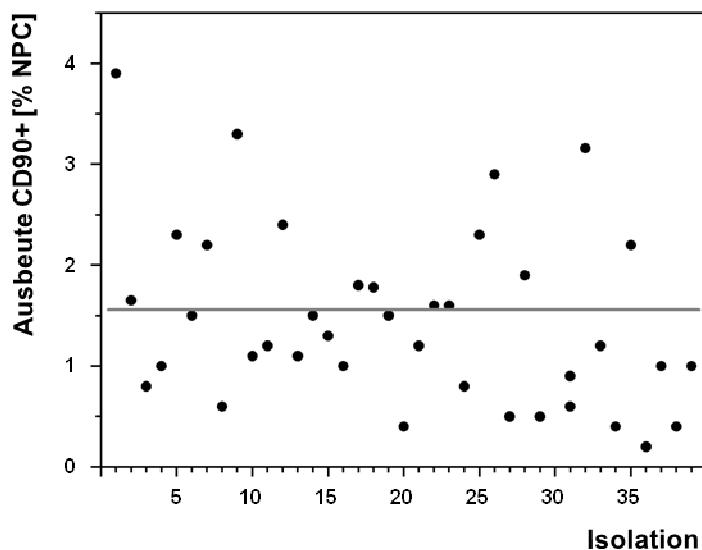


Abb. 14: Ausbeute an CD90+ Zellen aus der nichtparenchymalen Fraktion

Die Isolation von CD90+ Zellen aus nichtparenchymalen Fraktionen mittels immunomagnetischer Markierung wurde aus Zellfraktionen von insgesamt 39 Spendern durchgeführt. Die Ausbeute betrug dabei durchschnittlich $1,45\% \pm 0,86\%$ der NPC-Fraktion.

Ebenso wie bei der Isolation der nichtparenchymalen Zellfraktionen wurde auch bei der Isolation der CD90-Populationen untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Art des Ausgangsgewebes und dem daraus isolierten Anteil an positiven Zellen festgestellt werden konnte.

Das zur Zellisolation verwendete Ausgangsgewebe wurde nach der feingeweblichen Beurteilung durch die Pathologie der Uniklinik Regensburg in regeneratives (Fibrose, hepatische Tumoren) und nicht-regeneratives Gewebe Lebermetastasen von nicht-hepatischen Tumoren) eingeteilt. Bei Bezug der Ausbeute an CD90-Zellen auf die Art des Ausgangsgewebes zeigte sich, dass bei einer Isolation aus regenerierendem Gewebe signifikant mehr Zellen isoliert werden konnten (s. Abb. 15).

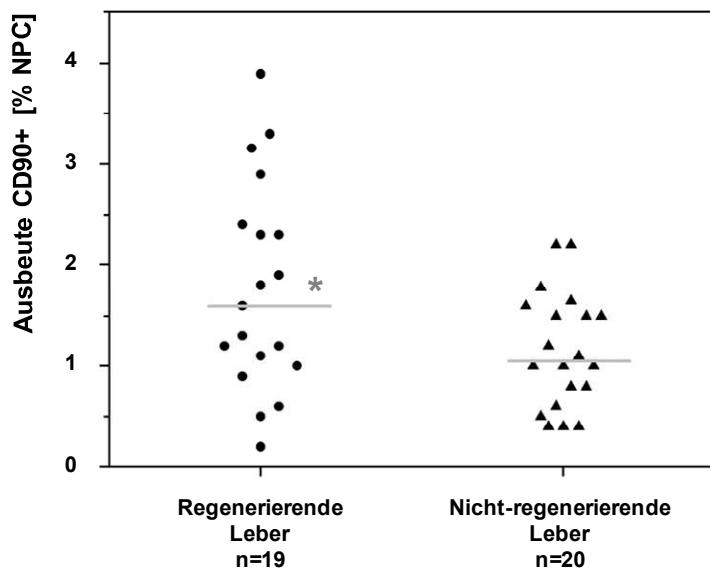


Abb. 15: Beurteilung der Ausbeute von CD90+ Zellen

Beim Vergleich der Isolationen von CD90+-Zellen zeigte sich eine signifikant höhere Ausbeute ($p<0,05$, Student's t-test) bei der Isolation der Zellen aus regenerativem Gewebe im Vergleich zu nicht-regenerativem Gewebe.

3.5 Charakterisierung der CD90+ Fraktion

3.5.1 Expression von Vorläuferzellmarkern

Um beurteilen zu können, ob die gewonnenen Fraktionen Vorläuferzellen der Leber darstellen könnten, wurden die frisch isolierten CD90-positiven Zellen mittels PCR auf die Expression verschiedener Vorläufermarker (AFP, ChromA, CK14, Nestin) untersucht.

Als Expressionskontrolle wurde β -Actin verwendet, als Positivkontrolle dienten HepG2 Zellen (AFP) bzw. RNA aus einem cholangiozellulären Karzinom (ChromA, CK14 und Nestin).

Insgesamt wurden Zellpellets aus 27 Isolationen untersucht. Dabei zeigte sich bei keiner der Isolationen eine RNA-Expression von AFP. Eine Expression von CK14 wurde bei allen 27 Proben festgestellt, während Chromogranin A und Nestin von jeweils 23 Zellpräparationen exprimiert wurden (s. Abb. 16).

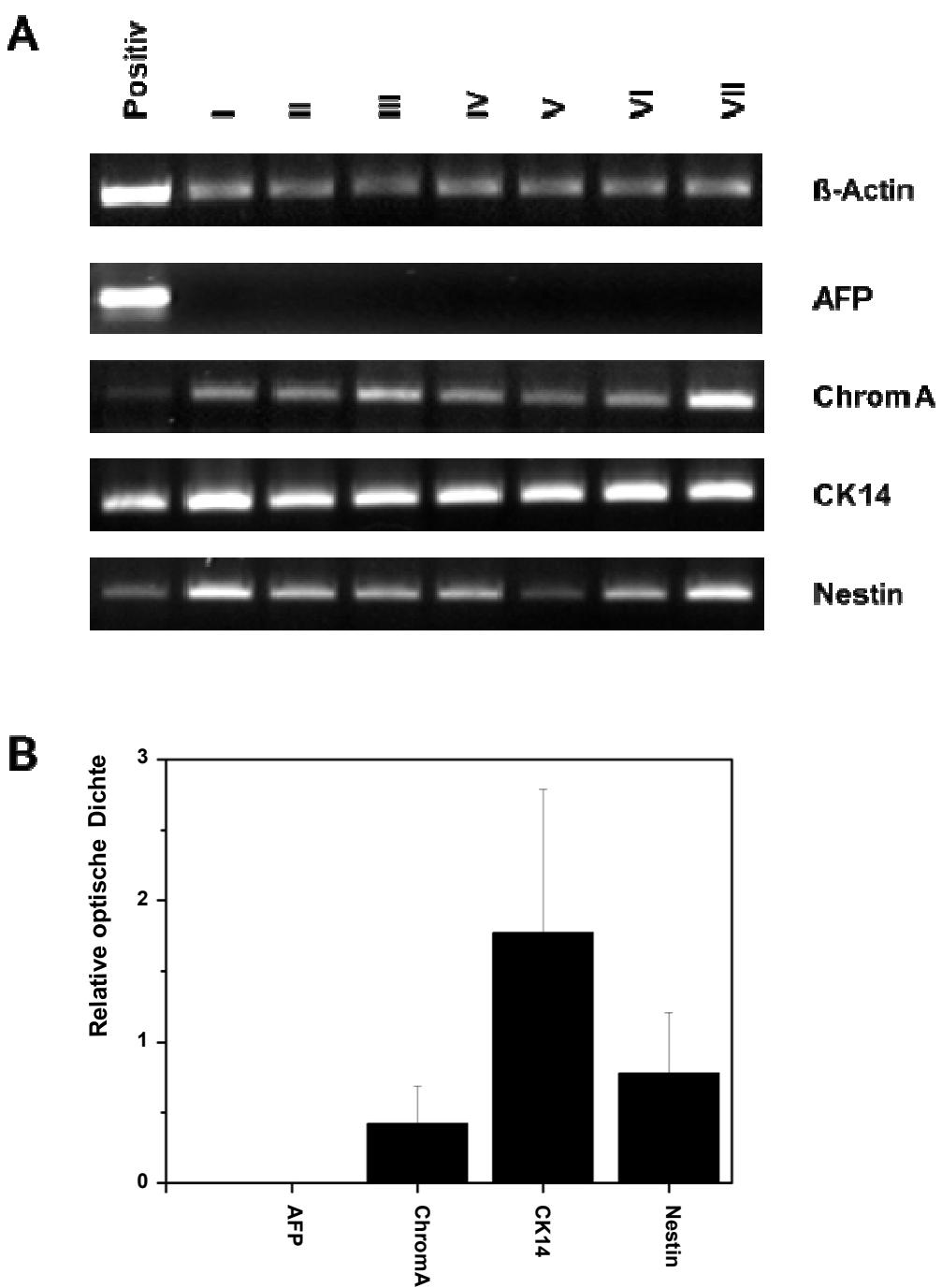


Abb. 16: Markerexpression von frisch isolierten CD90+-Zellen

Frisch isolierte CD90+-Zellen wurden mittels PCR auf die Expression verschiedener Vorläufermarker untersucht. Während AFP in keiner der untersuchten Zellpräparationen nachgewiesen werden konnte, zeigten 23 von 27 Proben eine Expression von Chrom A und Nestin. CK14 wurde in allen untersuchten Proben nachgewiesen. **A)** Repräsentative PCR-Banden aus 7 der 27 getesteten Proben. **B)** Relative optische Dichte der PCR-Banden als Mittelwert und Standardabweichung über jeweils alle getesteten Proben.

Zur Verwendung in immunhistochemischen Färbungen wurden frisch isolierte CD90+-Zellen auf Objekträger zentrifugiert und mit Antikörpern gegen die Vorläufermarker OV6, CK14 und M2-PK nach der APAAP-Methode angefärbt. Dabei zeigte sich, dass die CD90-positiven Fraktionen Subpopulationen von ca. 40-60% an OV6, CK14 bzw. M2-PK-positiven Zellen enthielten (s. Abb. 17). In den Fraktionen als Verunreinigung enthaltene Hepatozyten waren in keiner der Färbungen positiv.

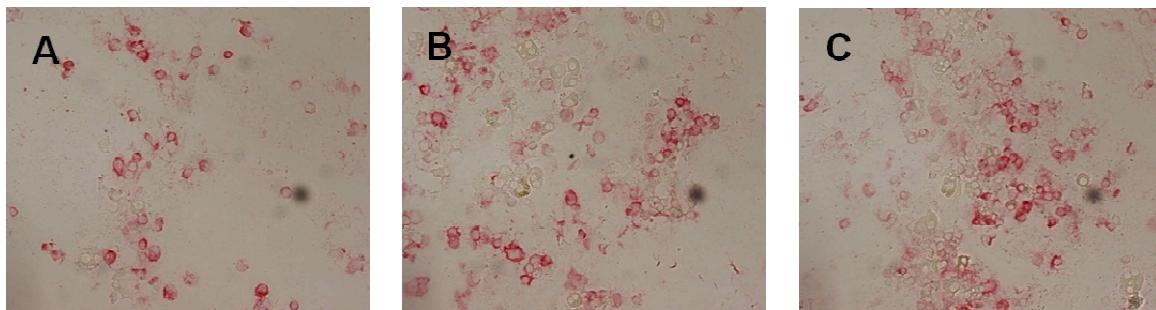


Abb. 17: Immunhistochemische Färbung von CD90+-Zellen

APAAP-Färbung von Cytospots aus CD90+-Zellen mit **A)** OV6, **B)** CK14 und **C)** M2-PK. Jeweils ca. 40-60% der CD90+-Fraktion waren positiv für die untersuchten Marker.

Eine Koexpression der verschiedenen Marker sollte durch eine Doppelfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden. Dafür wurden Zytospin-Präparate von CD90-positiven Zellen in einer Doppelfluoreszenzfärbung mit verschiedenen Antikörper-Kombinationen aus CK14 mit jeweils einem hematopoietischen Vorläufermarker (CD34 und CD117, s. Abb. 18) bzw. einem Marker für hepatische Vorläuferzellen (OV6 und M2-PK, s. Abb. 19) gefärbt. In allen Ansätzen konnten einzelne Zellen nachgewiesen werden, die positiv für beide Antikörper waren.

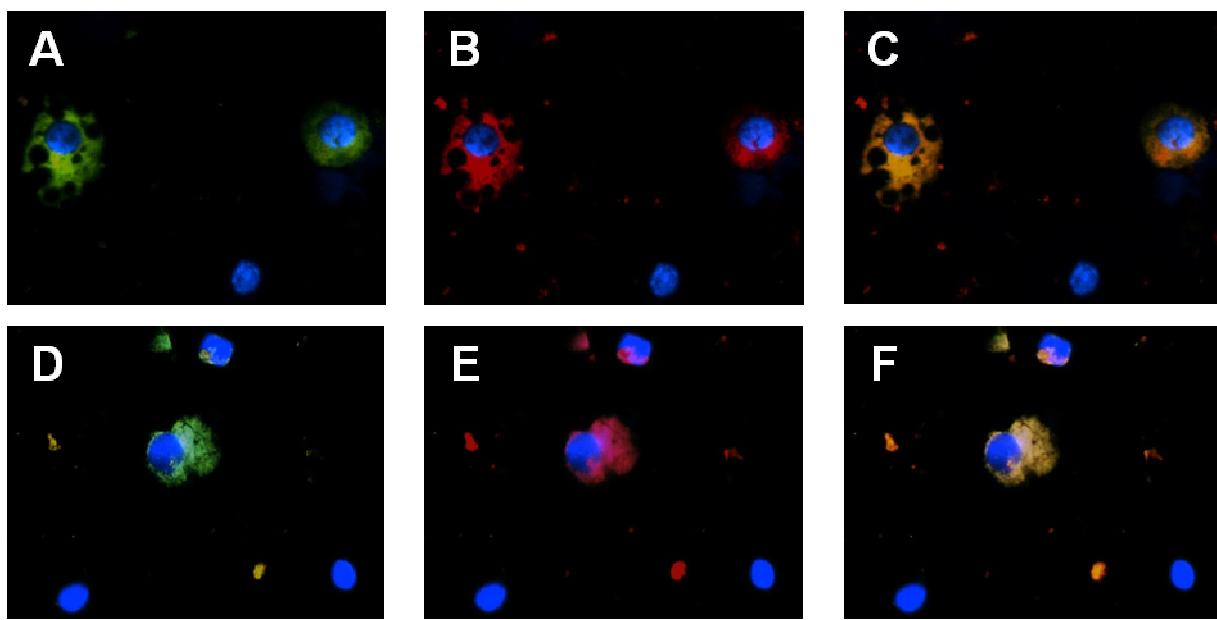


Abb. 18: Doppel-Fluoreszenzfärbung von CD90+-Zellen mit CK14 und hematopoietischen Vorläuferzellmarkern

Cytospots von CD90+-Zellen wurden mit Texas Red gekoppeltem CK14 und jeweils einem weiteren FITC-gekoppelten hematopoietischen Antikörper gefärbt. **A)** CD34-FITC, **B)** CK14-TR, **C)** overlay CK14/CD34, **D)** CD117-FITC, **E)** CK14-TR, **F)** overlay CK14/CD117. Bei allen Kombinationen ließen sich Zellen nachweisen, die jeweils positiv für beide Antikörper waren. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit H33258.

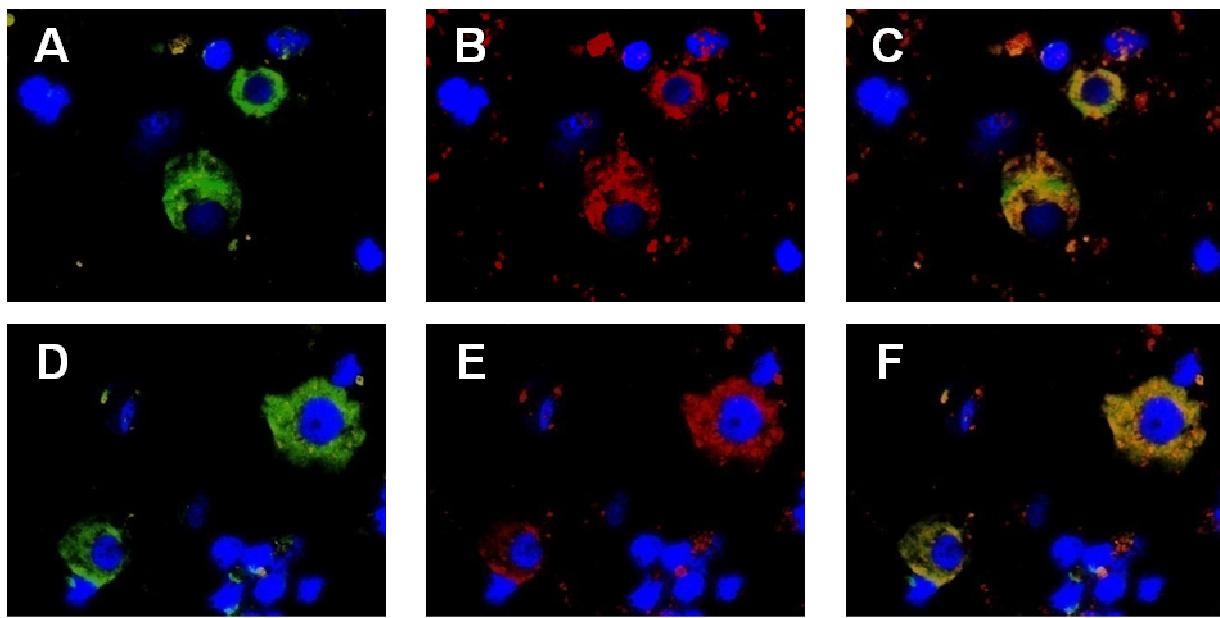


Abb. 19: Doppel-Fluoreszenzfärbung von CD90+-Zellen gegen CK14 und hepatische Vorläuferzellmarker

Cytospots von CD90+-Zellen wurden mit dem Texas Red gekoppelten Vorläufermarker CK14 und jeweils einem weiteren FITC-gekoppelten Antikörper gegen hepatische Vorläuferzellen gefärbt. **A)** OV6-FITC, **B)** CK14-TR, **C)** overlay CK14/OV6, **D)** M2-PK-FITC, **E)** CK14-TR, **F)** overlay CK14/M2-PK. Es konnten jeweils Zellen nachgewiesen werden, die doppelt positiv für die untersuchten Antikörper waren. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit H33258.

3.5.2 Expression von hepatischen Markern

Ebenso wie für Vorläufermarker wurden frisch isolierte CD90-positive Zellen mittels PCR auf die Expression verschiedener hepatischer Reifungsmarker (Albumin, CK7, CK18, CK19) untersucht. Als Expressionskontrolle diente β -Actin, als Positivkontrollen wurden wiederum HepG2 Zellen (Albumin und CK18) bzw. RNA aus einem cholangiozellulären Karzinom (CK7 und CK19) eingesetzt.

Insgesamt wurden Zellpellets aus 27 Isolationen untersucht. Bei keiner der Isolationen konnte eine RNA-Expression von CK7 nachgewiesen werden, während zehn der untersuchten Proben eine Expression von Albumin zeigten. Eine Expression von CK18 wurde bei 25 Isolationen festgestellt, die Expression von CK19 bei 23 Zellpräparationen (s. Abb. 20).

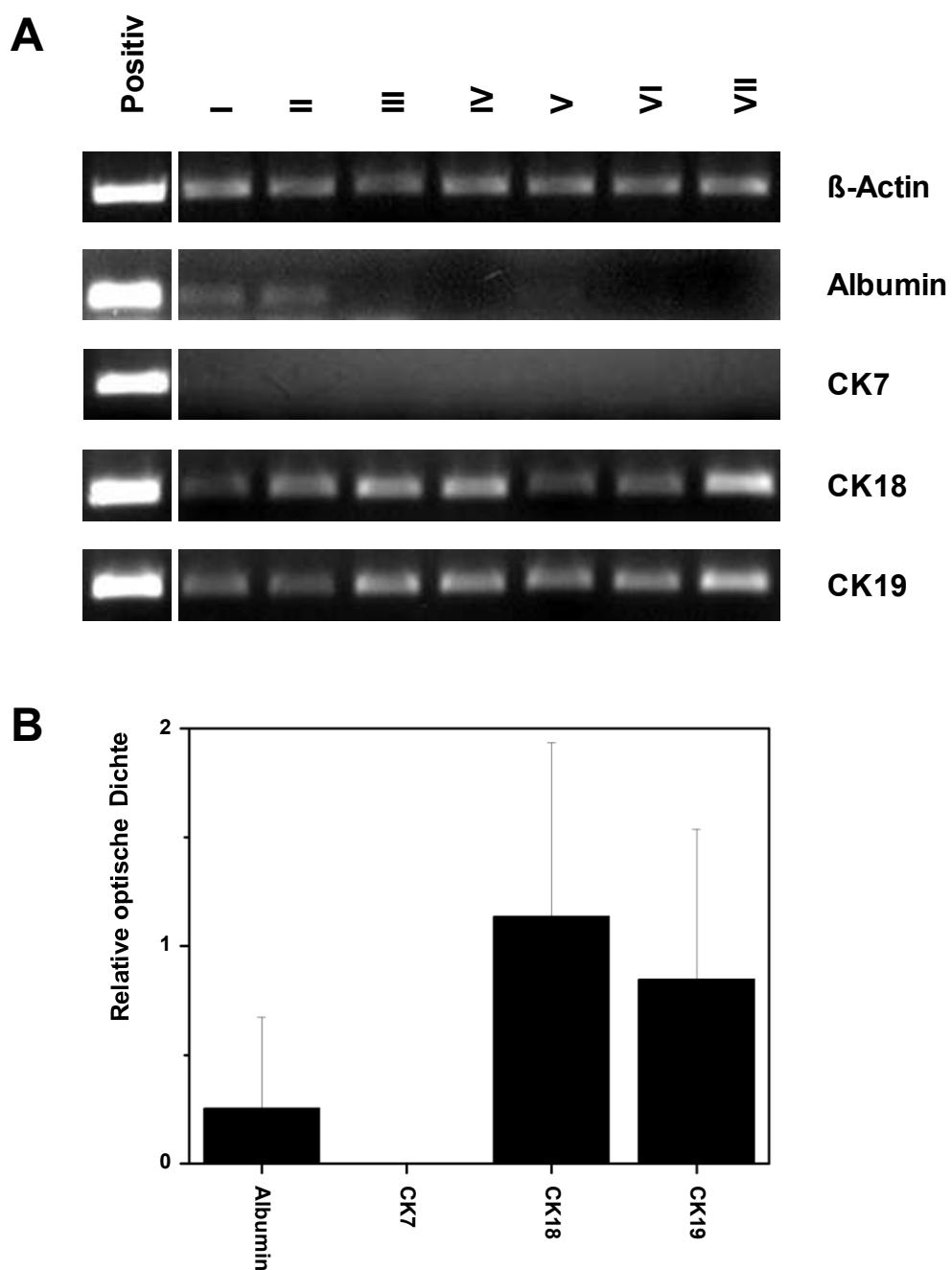


Abb. 20: Expression hepatischer Marker von frisch isolierten CD90+-Zellen

Frisch isolierte CD90+-Zellen wurden mittels PCR auf die Expression verschiedener hepatischer Differenzierungsmarker untersucht. Während CK7 in keiner der untersuchten Zellpräparationen nachgewiesen werden konnte und Albumin nur in vereinzelten Fällen gefunden wurde, zeigten 25 der Präparationen eine Expression von CK18 und 23 eine Expression von CK19. **A)** Repräsentative PCR-Banden aus 7 der 27 getesteten Proben. **B)** Relative optische Dichte der PCR-Banden als Mittelwert und Standardabweichung über jeweils alle getesteten Proben.

Zur Überprüfung der Koexpression von Vorläufermarkern mit hepatischen Markern wurden Zytospin-Präparate von CD90-positiven Zellen mit Antikörper-Kombinationen aus Texas-Red gekoppeltem Vorläufermarker CK14 und jeweils einem FITC-gekoppelten hepatischen Marker (CK19 bzw. HepPar1) angefärbt (s. Abb. 21). In beiden Ansätzen konnten einzelne Zellen nachgewiesen werden, die doppelt positiv für beide Antikörper waren.

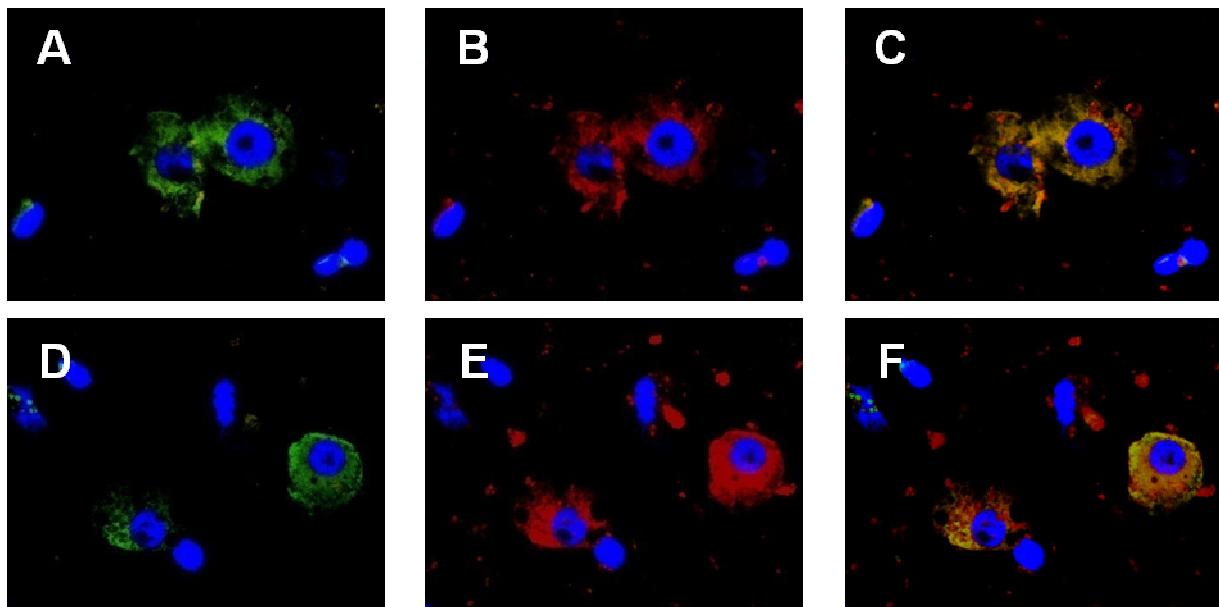


Abb. 21: Doppel-Fluoreszenzfärbung von CD90+-Zellen mit CK14 und hepatischen Markern

Cytospots von CD90+-Zellen wurden mit dem Texas Red gekoppelten Vorläufermarker CK14 und jeweils einem weiteren FITC-gekoppelten hepatischem Antikörper gefärbt. **A)** CK19-FITC, **B)** CK14-TR, **C)** overlay CK14/CK19, **D)** HepPar-1-FITC, **E)** CK14-TR, **F)** overlay CK14/HepPar1. Bei beiden Färbungen ließen sich Zellen nachweisen, die jeweils doppelt positiv für die untersuchten Antikörper waren. Die Färbung der Zellkerne erfolgte mit H33258.

3.6 Zellkultur von CD90+ Zellen

Da die Ausbeute an CD90-positiven Zellen durch die Größe der verfügbaren Leber- teilresekte beschränkt war, sollte ein geeignetes Zellkultursystem entwickelt werden, um die isolierten Zellen für weitere Untersuchungen expandieren zu können. Dafür wurden die Zellen in verschiedenen Aussaatmedien resuspendiert und in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Nach einer Adhäsionszeit von 3-5 Tagen erfolgte die Umstellung des Mediums auf das jeweilige Kulturmedium. Der Kulturverlauf der Zellen wurde täglich am Mikroskop kontrolliert. Bei Beendigung der Kultur wurden die Zellen entweder für immunhistochemische Färbungen in den Kulturschalen fixiert oder zur RNA-Gewinnung lysiert.

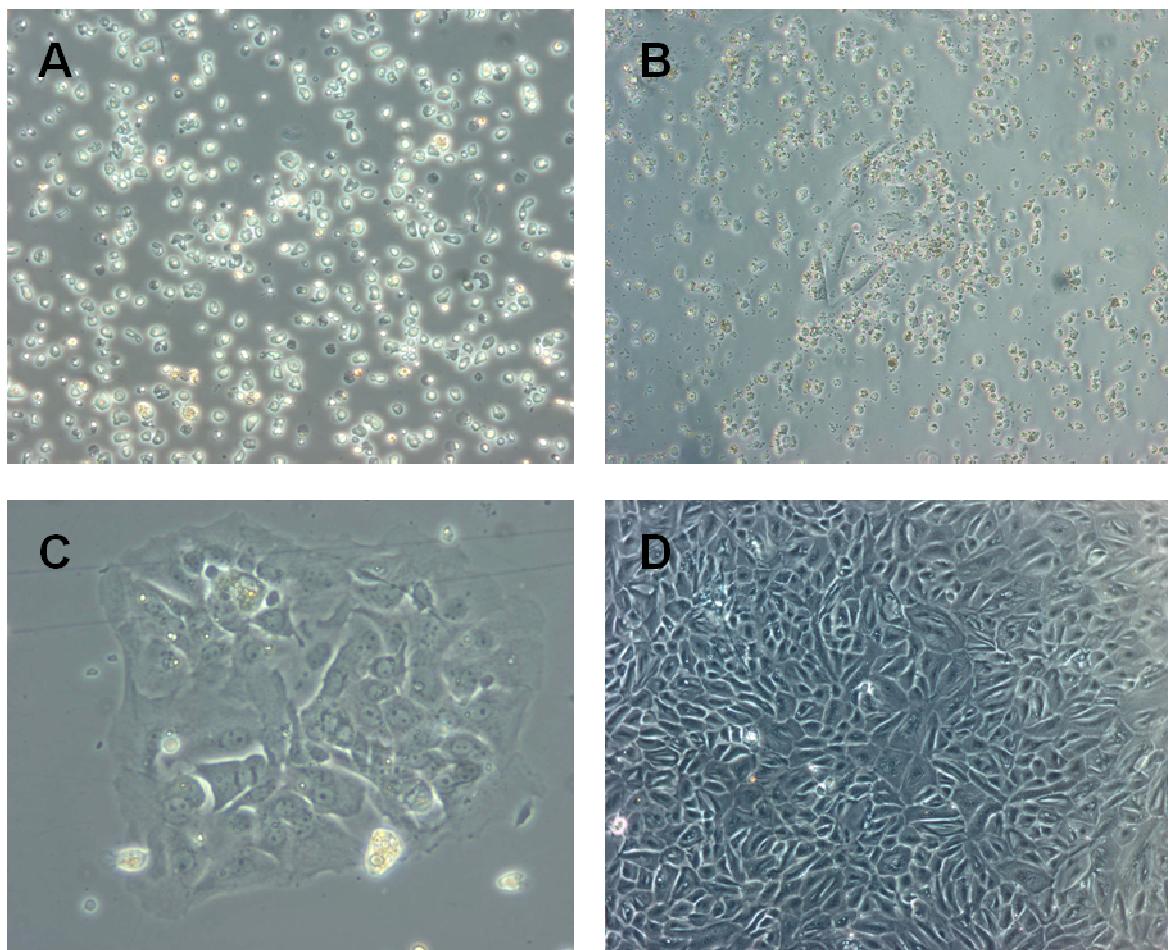


Abb. 22: Zellkultur von CD90-positiven Zellen

A) Tag 0, **B)** Tag 3, **C)** Tag 5 und **D)** Tag 28

In den ersten Tagen nach der Aussaat zeigten sich vereinzelte adhärierte Zellen, die im Verlauf von ca. einer Woche kleine Kolonien bildeten. Nach einer Kulturdauer von 28 Tagen bildeten die Zellen ein geschlossenes Monolayer. Dargestellt sind Zellen der Kulturreihe II.

In den Zellkulturen zeigten sich 1-2 Tage nach Aussaat vereinzelte adhärierte Zellen (s. Abb. 22 A), aus denen sich im Verlauf der nächsten Tage kleine Kolonien bildeten (s. Abb. 22 B). Nach einer Kulturdauer von 28 Tagen bildeten die Zellen einen geschlossenen Zellrasen (s. Abb. 22 D).

Es wurden insgesamt drei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt. Die erste Versuchsreihe erfolgte auf unbeschichteten Zellkulturplatten, Aussaatmedium und Kulturmedium waren identisch. Es wurden insgesamt Zellen von 17 Donoren ausgesät, doch nur bei sechs Donoren konnte ein Adhärieren und Wachstum der Zellen beobachtet werden. Die Kulturdauer für diesen Versuchsansatz betrug 14 (n=5) bzw. 28 Tage (n=1).

Die Versuchsreihen II und III wurden auf Kollagen-beschichteten Zellkulturplatten durchgeführt. Für beide Versuche wurden jeweils Zellen von sieben Donoren eingesetzt. Bei Versuchsreihe II konnten vier Ansätze über 14 Tage und ein Ansatz über 28 Tage kultiviert werden (s. Abb. 22), in der Versuchsreihe III adhärierten die Zellen in drei Versuchsansätzen und wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen (n=1) und 28 Tagen (n=2) kultiviert.

Neben der morphologischen Beurteilung der Zellen während der Kulturdauer wurden sie am Ende der Kultur bezüglich ihrer Markerexpression auf RNA-Ebene untersucht. Dabei zeigten die Zellen aus allen Versuchsansätzen vergleichbare Veränderungen im Verlauf der Kultur (s. Abb. 23 und 24). AFP konnte weder in frisch isolierten noch in kultivierten Zellen nachgewiesen werden. Die Expression der Vorläufermarker CK14 und Nestin nahm im Verlauf der Kultur ab, während bei der Expression von Chromogranin A eine Zunahme beobachtet werden konnte. Bei der Expression des Reifungsmarkers CK18 zeigte sich eine deutliche Zunahme, die Expression von CK19 nahm leicht ab. Albumin wurde nur von einigen frisch isolierten Zellen exprimiert und verschwand während der Kultivierung, lediglich in einem Kulturansatz aus der Versuchsreihe III konnte nach einer Kulturdauer von 28 Tagen ein Auftreten von Albumin beobachtet werden. CK7 wurde bei keiner Isolation in nicht-kultivierten Zellen gefunden. Nach Ablauf der Kultur konnte aber in allen Versuchsansätzen eine CK7-Expression nachgewiesen werden.

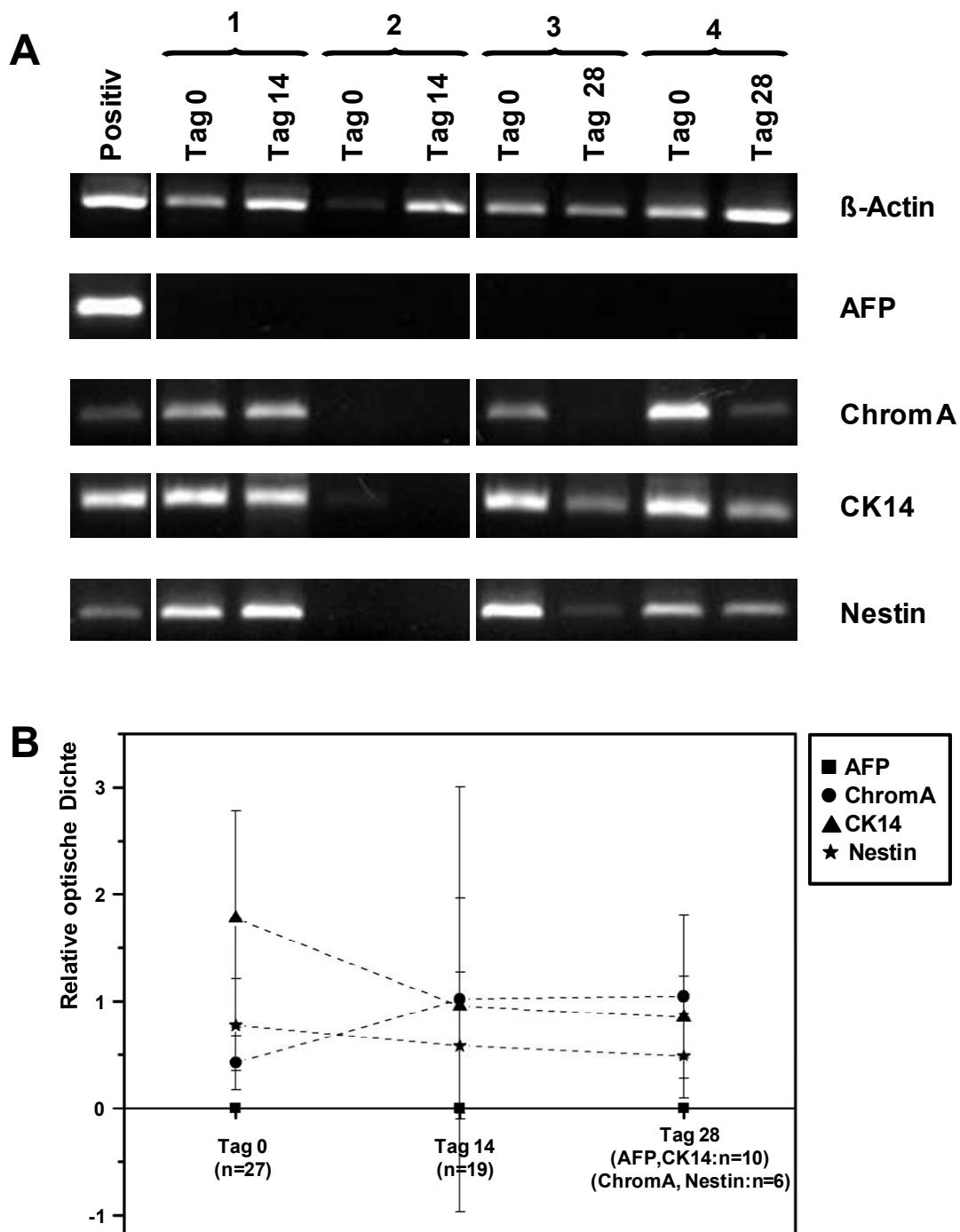


Abb. 23: Vergleich der Expression von Vorläufermarkern auf frisch isolierten und kultivierten CD90-Zellen

CD90+ Zellen wurden nach einer Kulturzeit von 14 (1 und 2) bzw. 28 (3 und 4) Tagen auf die Expression von Vorläufermarkern untersucht und die Expressionsmuster mit denen der frisch isolierten Zellen verglichen. **A)** Repräsentative PCR-Banden aus 7 der 27 getesteten Proben (1 und 3: Versuchsreihe I; 2: Versuchsreihe II und 4: Versuchsreihe III). **B)** Relative optische Dichte der PCR-Banden als Mittelwert und Standardabweichung über jeweils alle getesteten Proben ohne Unterscheidung zwischen den einzelnen Versuchsreihen. Während AFP in keinem Versuchsanlass nachgewiesen werden konnte, wurde in allen Fällen eine Abnahme von CK14 und Nestin beobachtet. Bei der Expression von ChromA konnte im Verlauf der Kultur eine Zunahme festgestellt werden konnte.

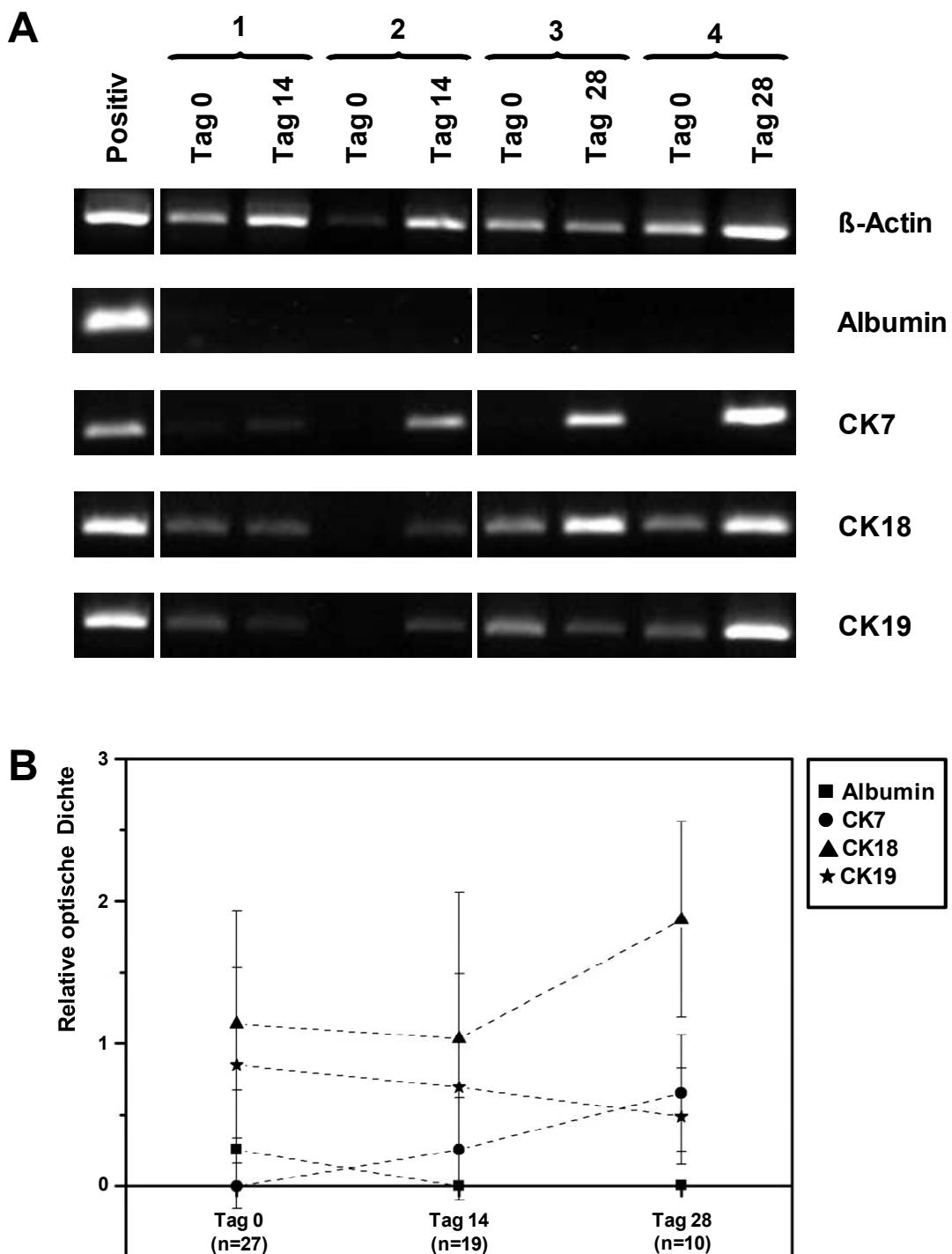


Abb. 24: Vergleich Markerexpression von frisch isolierten und kultivierten CD90-Zellen

CD90+ Zellen wurden nach einer Kulturzeit von 14 (1 und 2) bzw. 28 (3 und 4) Tagen auf die Expression von hepatischen Differenzierungsmarkern untersucht und die Expressionsmuster mit denen der frisch isolierten Zellen verglichen. **A)** Repräsentative PCR-Banden aus 7 der 27 getesteten Proben (1 und 3: Versuchsreihe I; 2: Versuchsreihe II und 4: Versuchsreihe III). **B)** Relative optische Dichte der PCR-Banden als Mittelwert und Standardabweichung über jeweils alle getesteten Proben ohne Unterscheidung zwischen den einzelnen Versuchsreihen. Albumin konnte in einem Versuch nach 28 Tagen Kulturdauer nachgewiesen werden. Bei CK19 zeigte sich eine leichte Abnahme der Expression im Verlauf der Kultur, während bei CK7 und CK18 eine deutliche Zunahme beobachtet werden konnte.

Zusätzlich zur Untersuchung der Markerexpression auf RNA-Ebene wurden die Zellen am Ende der Zellkultur in den Kulturschalen mit Paraformaldehyd fixiert und auf cholangiozytäre (CK7) und hepatozytäre (HepPar1) Marker gefärbt (s. Abb. 25). Dabei zeigte sich, dass in beiden Fällen jeweils ein Großteil der adhärierten Zellen positiv für den untersuchten Marker war.

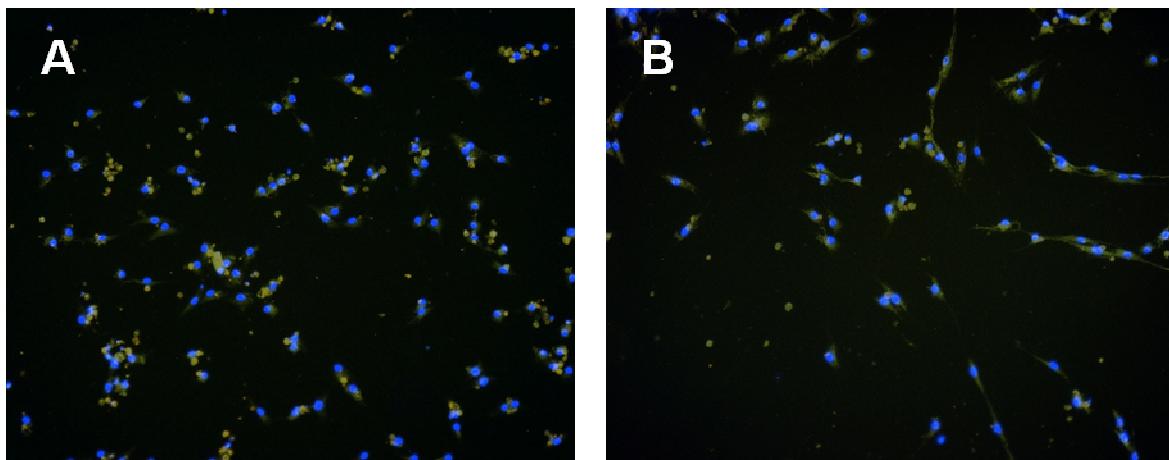


Abb. 25: Immunhistochemische Färbung von kultivierten CD90+ -Zellen

Nach einer Kulturdauer von 14 Tagen wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen cholangiozytäre **A)** CK7 und hepatozytäre Marker **B)** HepPar1 gefärbt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit H33258. Dargestellt ist eine Färbung mit Zellen aus der Versuchsreihe II.

4 Diskussion

4.1 Nachweis von möglichen Vorläuferzellen in humanem Lebergewebe

Die Leber besteht aus vielen unterschiedlichen Zelltypen (s. Tab. 5). Die größte Population bilden dabei die Parenchymzellen der Leber, die Hepatozyten, mit einem Anteil von 60-70% an allen vorhandenen Leberzellen und einem Anteil von ca. 78% am Lebervolumen. Hepatozyten sind polygonale Epithelzellen mit 6 oder mehr Flächen und einem Durchmesser von 15-35 µm. Hepatozyten sind die wichtigsten Leberzellen, da in ihnen der Hauptanteil aller in der Leber ablaufenden Prozesse erfolgt¹¹³.

Die zweite Gruppe der Leberepithelzellen stellen die Cholangiozyten dar. Sie bilden das verzweigte System der intrahepatischen Gallengänge. Sie spielen eine wichtige Rolle beim hormonal gesteuerten Transport von Wasser und Elektrolyten und bei der Entgiftung von Xenobiotika¹¹⁴.

Sinusendothelzellen bilden das fenestrierte Endothel der Sinusoide, in denen sich portal und arteriell herangeführtes Blut vereinigt. Durch die Sinusendothelzellen wird der Flüssigkeits- und Materialaustausch zwischen dem Blut in den Sinusoiden und den Hepatozyten geregelt¹¹⁵.

Kupffer-Zellen (Kupffer'sche Sternzellen) sind im Sinusendothel zufällig verteilt. Sie sind von irregulärer, sternförmiger Form und besitzen eine zottenförmige Oberfläche. Zu ihren Aufgaben gehören die Phagozytose, die Pinozytose, die Abgabe von Signalsubstanzen und das Ausscheiden von toxischen Substanzen¹¹⁶.

Ito-Zellen sind Fettspeicherzellen, die im Disse'schen Raum in engem Kontakt zu Hepatozyten und Endothelzellen zu finden sind. Ito-Zellen können sich in Myofibroblasten umwandeln und spielen daher eine Rolle bei der Fibrogenese¹¹⁷.

Tab. 5: Die verschiedenen Zelltypen der Leber^{118,119}

Zelltyp	Lokalisation	Größe [µm]	Dichte [g/cm ³]	Zellzahl/g (× 10 ⁶)	Anteil [%]
Epithelzellen					
Hepatozyten	lobulär	15-35	1.08-1.13	110 ± 20	60-70% der Leberzellen
Cholangiozyten	PT	5-15	1.06-1.11	3.4 ± 0.4	2-3% der Leberzellen 5-10% der NPC-Fraktion
Zellen des retikulären endothelialen Systems					
Kupffer-Zellen	S	6-12	1.05-1.08	27 ± 3	8-12% der Leberzellen 25-40% der NPC-Fraktion
Sinusoidale Endothelzellen	S	9-14	1.03-1.07	37 ± 4	15-20% der Leberzellen 44-60% der NPC-Fraktion
Struktur- und fetspeichernde Zellen					
Ito-Zellen	S, D	9-13	1.02-1.06	18 ± 2	3-8% der Leberzellen 5-10% der NPC-Fraktion
Fibroblasten					
Myofibroblasten	PT				
Gefäßendothelzellen					
Endothelzellen der Arterien, Venen und lymphatischen Gefäße	PT	9-14	1.03-1.07		
Glatte Muskelzellen der Arterien	PT				
Verschiedene Zelltypen					
Pit Zellen (große granuläre Leukozyten)	S	8-12	1.05-1.07	1.5 ± 0.4	ca. 1% der NPC-Fraktion
Dendritische Zellen	S, PT		< 1.082		
Hepatische Neurone	PT				

Für die spätere Charakterisierung von isolierten Zellfraktionen wurde zunächst ein geeignetes Markerpanel zusammengestellt, mit dem an humanem Lebergewebe sowohl hepatische Zellen als auch mögliche Vorläuferzellpopulationen identifiziert werden konnten.

Die Expression von Albumin und HepPar1 kann als Nachweis von Hepatozyten eingesetzt werden. Sie findet sowohl in reifen Hepatozyten als auch in Zellen, die in Richtung einer hepatozytären Differenzierung determiniert sind, statt^{120,121}.

Ebenso wie andere Epithelzellen zeigen auch Hepatozyten und Gallengangszellen eine spezifische Expression von verschiedenen Zytokeratinen. Während Hepatozyten lediglich CK8 (52 kDa, Typ II) und CK18 (45 kDa, Typ I) exprimieren, finden sich auf Gallengangszellen zusätzlich noch CK7, ein 54 kDa Zytokeratin vom Typ II, und CK19, ein Typ I Zytokeratin mit einem Molekulargewicht von 40 kDa¹²².

Bei HEA125 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen das epithiale Zelladhäsionsmolekül (Ep-CAM). Ep-CAM ist ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, das von einer Vielzahl von Zellen epithelialen Ursprungs exprimiert wird. In der Leber erkennt der Klon HEA125 sowohl reife Gallengangszellen, als auch noch unreife Zellen mit cholangiozytärer Determinierung¹²³.

CD31 ist auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen und Sinusendothelzellen zu finden¹²⁴.

Mit CD68, einem Marker, der von Zellen der Monozyten- und Makrophagen-Abstammungslinie¹²⁵ exprimiert wird, können in der Leber Kupffer-Zellen nachgewiesen werden¹²⁶.

Zum Nachweis von Ito-Zellen, den Vitamin A- und Fettspeicherzellen der Leber, die im Disse'schen Raum in engem Kontakt zu Hepatozyten und Endothelzellen zu finden sind¹²⁷, kann Sma-α verwendet werden¹²⁸.

Bei CD34 handelt es sich um ein Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa. Die Besonderheit dieses Proteins besteht darin, dass es als einziger Marker sowohl von hematopoietischen Stammzellen exprimiert wird als auch von allen unreifen Zellen des hematopoietischen Systems, die bereits entlang der verschiedenen Entwicklungslinien differenzieren. Reife Blutzellen exprimieren diesen Marker jedoch nicht mehr, so dass er große Anwendung bei der Isolation und Charakterisierung von Zellpopulationen mit unreifem Charakter des hematopoietischen Systems gefunden hat. Neben dem hematopoietischen System befindet sich dieser

Marker u.a. auch noch auf den Endothelzellen kleiner Gefäße und auf embryonalen Fibroblasten^{129,130}.

CD90 (Thy-1) ist mit einem Molekulargewicht von ca. 25 kDa der kleinste Vertreter der Immunglobulinsuperfamilie. CD90 wird von den verschiedenen Spezies und innerhalb der verschiedenen Gewebe einer Spezies unterschiedlich stark exprimiert. Die genaue Funktion des Moleküls ist bisher noch unbekannt. In der Maus findet man eine Expression auf hematopoietischen Stammzellen, peripheren Lymphozyten, Neuronen und auf Fibroblasten. Beim Menschen wird CD90 von einer kleinen Unterpopulation von CD34+ Zellen im Knochenmark und auf Stammzellen im Nabelschnurblut und in der fetalen Leber exprimiert. Außerdem befindet sich das Molekül auf einigen frühen T und B Lymphozyten, auf Fibroblasten und neuronalen Zellen^{131,132}.

Bei dem Transmembranprotein CD117 (*c-kit*) handelt es sich um einen Wachstumsfaktor-Rezeptor. Der von diesem Rezeptor erkannte Ligand, der Stammzellfaktor, besitzt große strukturelle Ähnlichkeiten mit den Kolonie-stimulierenden Faktoren und spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von epithelialen Stammzellen bei der Hematopoiese und Gametogenese. Neben hematopoietischen Stammzellen wird CD117 von Mastzellen, Keimzellen und Melanozyten exprimiert^{133,134}.

Bei OV-6 handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der zum Nachweis von oval cells in der Ratte entwickelt wurde^{135,136}. Auch an humanem Gewebe wurde OV-6 erfolgreich eingesetzt und zwar sowohl in fetalem Gewebe¹³⁷, als auch in pediatrischem und adulten Gewebe^{138,139}. In der Ratte erkennt dieser Antikörper die Antigene der Zytokeratine 14 und 19¹⁴⁰. In der menschlichen Leber werden durch diesen Antikörper sowohl reife Gallengangszellen und Hepatozyten im Bereich des Periportalfeldes angefärbt, als auch Populationen, die mit den oval cells in der Ratte vergleichbar sind¹⁴¹.

Zytokeratin 14 ist ein Intermediärfilament, das ursprünglich nicht mit der Leber in Verbindung gebracht wurde¹⁴², das dann aber auf einer kleinen Population von gallengangs-assoziierten Zellen nachgewiesen wurde¹⁴³. Seitdem wurde CK14 bereits mehrmals als möglicher Marker für Vorläuferzellen in der Leber identifiziert, wo es eine Subpopulation von Stammzellen anfärbt, die entlang der hepatischen Entwicklungslien ausdifferenzieren können^{144,145}. Auf reifen Hepatozyten und Gallengangszellen konnte es jedoch nicht nachgewiesen werden¹⁴⁶. Bei CK14-positiven Zellen handelt es sich also auf jeden Fall um unreife Zellen, weswegen dieser Marker als

Kombinationsmarker für immunhistochemische Doppelfärbungen zur genaueren Charakterisierung der erhaltenen CD90-Populationen verwendet wurde.

Die fetale M2 Isoform der Pyruvatkinase (M2-PK) stellt einen weiteren Marker für un-differenzierte Leberzellen dar. Sowohl im Tiermodell^{147,148} als auch an humanen Zell-linien¹⁴⁹ konnte eine Expression dieses Markers auf undifferenzierten Zellen nach-gewiesen werden. In erkrankten Lebern wurde ein Zusammenhang der Expression mit der Schwere der jeweiligen Erkrankung festgestellt¹⁵⁰. Im Gegensatz dazu zeigen reife Hepatozyten keine M2-PK Expression¹⁵¹.

Mit allen verwendeten Antikörpern wurden zunächst Färbungen an 6 µm Gewebe-schnitten von humanem Lebergewebe durchgeführt. Die Färbungen der hepatischen Differenzierungsmarker entsprachen dabei den in der Literatur beschriebenen Fär-bungsmustern, die einzelnen Zelltypen konnten jeweils eindeutig lokalisiert und iden-tifiziert werden. Schwieriger gestaltete sich der Nachweis von Vorläuferzellen. Nach den Ergebnissen, die in verschiedenen Tiermodellen erhalten wurden, sollte das Vor-läuferzellkompartiment der Leber im Bereich des Periportalfeldes und in den Hering-schen Kanälchen zu finden sein, da von diesen Strukturen ausgehend die Proliferati-on der oval cells im Falle einer Leberschädigung zu beobachten ist¹⁵². Die Färbung für CD90 zeigte eine größere Anzahl an positiven Zellen sowohl im Periportalfeld als auch entlang von Gallengängen innerhalb des Parenchyms. Da jedoch CD90 auch auf Fibroblasten exprimiert wird und damit die stark positive Färbung im Bereich der Portalfelder auch durch die Färbung von Bindegewebszellen verursacht wurde, war auf diese Weise eine eindeutige Identifizierung der positiven Zellen als Vorläuferzel-len nicht möglich. Das gleiche Problem ergab sich bei den Färbungen von CD34 und OV6. Auch hier zeigten die Schnitte relativ intensive Färbungsmuster. Da jedoch CD34 auch von Endothelzellen exprimiert wird und OV6 auch auf Gallengangszellen zu finden ist, konnte auch hier nicht zwischen reifen Leberzellen und möglichen Vor-läuferzellen unterschieden werden.

Der hematopoietische Vorläufermarker CD117 konnte dagegen nur an vereinzelten Zellen gefunden werden, während CK14 und M2-PK in keiner der durchgeföhrten Färbungen nachgewiesen werden konnte. Die Ursache hierfür ist wohl in der zu ge-ringigen Anzahl an durchgeföhrten Färbungen zu suchen.

4.2 Isolation von nichtparenchymalen Zellen

Das Vorhandensein von Populationen mit Vorläufereigenschaften in der Leber konnte im Tiermodell bereits mehrfach gezeigt werden. Die ersten Versuche nutzten dabei verschiedene Modelle, in denen durch partielle Hepatektomie bei gleichzeitiger Inhibierung der Hepatozytenproliferation eine Leberregeneration durch Vorläuferzellen erzwungen wurde¹⁵³. Auch beim Menschen konnten mittlerweile durch immunhistochemische Studien mehrfach vergleichbare Zellpopulationen nachgewiesen werden und zwar sowohl in fetalen Lebern als auch in erkrankten und gesunden adulten Lebern. Bei diesen Zellpopulationen, die sich im Periportaltrakt im Bereich der Herringsschen Kanäle befanden, handelte es sich jeweils um kleine Zellen im Größenbereich von 7-15 µm mit nur wenigen Organellen und einem geringen Anteil an Zytoplasma¹⁵⁴. Diese in der Literatur beschriebenen Zellpopulationen, die als Vorläuferzellen der Leber in Frage kommen, unterscheiden sich demnach sowohl in Größe und Dichte deutlich von den Hepatozyten, die einen Großteil (ca. 60%) der in der Leber vorhandenen Zellen darstellen (s. Tab. 1) und bilden somit eine Subpopulation der nichtparenchymalen Zellfraktion der Leber. Da die Anzahl an Zellen in diesen Subpopulationen nur gering ist, war es für die Gewinnung von Vorläuferzellpopulationen aus humanen Leberresektaten daher zweckmäßig, durch die Isolation von nichtparenchymalen Zellen Zellfraktionen zu gewinnen, in denen bereits eine Anreicherung dieser Zellen erfolgt war.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Verfahren zur Isolation von nichtparenchymalen Zellen aus humanen Leberresektaten basiert auf einem Protokoll, das von der Gruppe um A. Strain entwickelt wurde¹⁵⁵.

Im Gegensatz zu dem dort verwendeten Protokoll wurde hier jedoch ein Reinigungsansatz gewählt, bei dem nicht das komplette Gewebe verdaut wurde. Stattdessen wurde in einem ersten Reinigungsschritt durch eine Collagenase/EGTA-Perfusion ein Großteil der Hepatozyten abgetrennt und erst anschließend ein kompletter Verdau des Restgewebes zur Gewinnung der nichtparenchymalen Zellen durchgeführt. Die Inkubationszeiten beim Verdau des kleingeschnittenen Gewebes konnten deswegen entsprechend um die Hälfte gekürzt werden.

Zusätzlich wurde der Enzymlösung beim Verdau Pronase zugesetzt, mit dem noch verbliebene Hepatozyten zerstört werden sollten. Das Gewebe konnte auf diese

Weise fast vollständig verdaut werden, nach dem letzten Filtrationsschritt blieben jeweils lediglich vereinzelte Stränge aus Bindegewebe zurück. In mehreren Waschschritten konnten vor allem Fettzellen aus der Suspension entfernt werden. Dem verwendeten Waschpuffer wurde EDTA zugesetzt, um ein Verklumpen von toten Zellen zu vermeiden.

Anschließend erfolgt im Grundprotokoll eine Auftrennung der Zellsuspension durch einen Zweischicht-Percoll mit Dichten von 1,04 und 1,09 g/ml. Daraus erhalten Fabris et al 5 Fraktionen, nämlich Pellet, 1,09 g/ml Percoll, Zwischenschicht, 1,04 g/ml Percoll und Überstand, die sehr ausführlich bezüglich Größe und Zelltyp charakterisiert wurden. Die Hauptmenge an vitalen nichtparenchymalen Zellen befindet sich demnach in der Zwischenschicht des Percolls und ein weiterer Teil in der Schicht aus 1,04 g/ml Percoll, während in der Schicht aus 1,09 g/ml Percoll nur sehr wenige Zellen enthalten waren. Das Pellet bestand hauptsächlich aus Erythrozyten, während sich im Überstand tote Zellen und Zelldebris befanden. Um eine möglichst große Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen zu erhalten, wurde das Protokoll für die weiteren Aufarbeitungen auf einen Einschicht-Percoll mit einer Dichte von 1,09 g/ml vereinfacht.

Auch die aus dieser Aufreinigung erhaltenen Fraktionen wurden sowohl durch eine Zellzahl-/Zellgrößenbestimmung am „cell counter“, als auch durch eine immunhistochemische Färbung auf verschiedene Hepatozyten- und nichtparenchymale Marker charakterisiert. Die erhaltenen Fraktionen entsprachen den in der Literatur beschriebenen Fraktionen. Im Überstand werden Hepatozyten und Agglomerate aus Bindegewebe abgetrennt, während das Pellet hauptsächlich aus Erythrozyten bestand. Der Hauptteil an vitalen nichtparenchymalen Zellen war in der Zwischenschicht zwischen Percoll und wässriger Phase enthalten.

Der Anteil an nichtparenchymalen Zellen in der Leber liegt im Bereich von 30-40% der Gesamtzellzahl, was einem Anteil von etwa $5-8 \times 10^7$ Zellen/g Lebergewebe entspricht (s. Tab 1). Im Grundprotokoll und in weiteren vergleichbaren Protokollen^{156,157} konnte eine Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen von $1-4 \times 10^6$ /g Lebergewebe erreicht werden. Die durch das in dieser Arbeit verwendete Verfahren erreichte Ausbeute lag mit $2,7 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ /g Resektatgewebe innerhalb dieses zu erwarteten Bereiches. Die großen Abweichungen der erreichten Ausbeuten von der tatsächlich vorhandenen Zellzahl lassen sich durch Verluste bei der vorher durchgeföhrten Isola-

tion von Hepatozyten erklären, ebenso durch das Auswaschen von Fettzellen während der Waschschrifte und die Zerstörung von Zellen während des Gewebeverdaus. Die etwas schlechtere Vitalität von >80% im Vergleich mit einer Vitalität von >95% beim Grundprotokoll erklärt sich dadurch, dass die Vitalitätsbestimmung aus zeitlichen Gründen nicht sofort erfolgen konnte, sondern die Zellen zunächst über Nacht bei 4°C gelagert wurden.

4.3 Charakterisierung der nichtparenchymalen Fraktion

Da die nichtparenchymale Zellfraktion als Ausgangsfraktion für die Isolation von Vorläuferzellen dienen sollte, war es wichtig, dass die Isolation dieser nichtparenchymalen Fraktionen in möglichst standardisierter Weise erfolgte. Zur Beurteilung der Aufarbeitung sollte daher untersucht werden, ob sich die Qualität des Ausgangsgewebes auf die Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen auswirkt. Anhand der feingeweblichen Beurteilung des Gewebes durch die Klinik für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg wurde das Ausgangsgewebe in fünf Gruppen mit unterschiedlichen Primärerkrankungen eingeteilt. Berücksichtigt wurden dabei Fibrose, Zirrhose, Cholestase, Verfettung und Entzündung des Gewebes. Dabei zeigte sich, dass sich keine dieser Erkrankungen signifikant auf die Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen auswirkte, so dass mit dieser Methode eine Zellpopulation mit konstant bleibender Qualität isoliert werden konnte.

Als entscheidend für die gezielte Isolation von Vorläuferpopulationen hat sich der Nachweis von verschiedenen Oberflächenantikörpern auf diesen Zellen erwiesen. Hervorzuheben sind hierbei besonders die hematopoietischen Marker CD34, CD90 (Thy-1) und CD117 (*c-kit*). Die ersten Hinweise auf eine Verbindung dieser hematopoietischen Marker auch mit dem hepatischen Stammzellsystem ergaben sich aus verschiedenen Studien, in denen die Aktivierung und Proliferation von Vorläuferzellen durch eine Schädigung der Leber erzielt wurde^{158,159}. Durch eine immunomagnetische Reinigung mit CD34 und CD117 konnten bereits von einer anderen Arbeitsgruppe aus HEA125-negativen nichtparenchymalen Zellfraktionen Zellen isoliert werden, die in Zellkultur zu Gallengangszellen differenziert werden konnten¹⁶⁰.

Für die spätere Isolation einer möglichen Vorläuferzellpopulation sollte daher zunächst die Zusammensetzung der erhaltenen nichtparenchymalen Zellsuspensionen ermittelt werden. Dafür wurden die Zellsuspensionen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert und die Zellen anschließend am Durchflusszytometer untersucht. Neben den bereits erwähnten hematopoietischen Markern CD34, CD90 und CD117 wurden noch die nichtparenchymalen Marker CD31 und HEA125 hinzugezogen, sowie der ebenfalls aus dem hematopoietischen System stammende Marker CD45.

Die Populationen an CD34, CD90 und CD117 positiven Zellen lagen in einem vergleichbaren Größenbereich von jeweils knapp 10%. Dieser relativ hohe Anteil erklärt sich weniger aus einer Verunreinigung der Zellsuspension durch Blutzellen, was besonders dadurch belegt wird, dass in den Zellen der nichtparenchymalen Fraktion in einem CFU-Assay kein hematopoietisches Potential mehr nachgewiesen werden konnte. Vielmehr erklärt sich dieser Anteil aus der Tatsache, dass jeder dieser Marker auf mehreren weiteren nichtparenchymalen Zelltypen zu finden ist.

Der Anteil an Gefäßendothelzellen und Sinusendothelzellen an der NPC-Fraktion, der mit CD31 nachgewiesen wurde, sollte im Bereich von 40-60% liegen. Mit einem gemessenen Anteil von $13,3\% \pm 7\%$ lag diese Zellpopulation daher weit unter der erwarteten Menge. In der Literatur beschriebene Methoden zur Isolation von Sinusendothelzellen im großen Maßstab verwenden jedoch als Ausgangszellsuspension die Überstände nach der Perfusion des Gewebes mit Collagenase¹⁶¹, was bedeutet, dass sich diese Zellen sehr leicht aus dem Zellverband herauslösen lassen und damit zum Großteil bereits im Verlauf der Hepatozyten-Isolation abgetrennt wurden.

Der Anteil an Gallengangszellen wurde mit HEA125 ermittelt. Mit $4,8\% \pm 4,2\%$ lag diese Population innerhalb des erwarteten Bereichs von 5-10%.

Erstaunlich war der hohe Anteil an CD45+ Zellen in den erhaltenen Zellfraktionen, denn dieser Marker wird im Normalfall mit Leukozyten in Verbindung gebracht¹⁶². Die große Überschneidung dieses Markers mit CD31 (50%) und HEA125 (30%) zeigt jedoch, dass es sich bei diesen Zellen nur zu einem geringen Anteil um Blutzellen handeln kann, sondern dass CD45 offensichtlich auch auf anderen Zelltypen zu finden ist. Ein Zusammenhang von CD45 mit hepatischen Vorläuferzellen wird indes kontrovers diskutiert. Während in vielen Versuchsansätzen CD45-Zellen als Verunreinigungen durch Blutzellen angesehen und ausgeschlossen werden¹⁶³, konnte in anderen Studien CD45 als oval cell Marker nachgewiesen werden¹⁶⁴.

Ebenso wie CD45 zeigen auch die übrigen hematopoietischen Marker eine Überschneidung mit anderen Zellpopulationen. Die Doppelfärbung von CD34 mit CD31 erklärt sich durch das Vorhandensein von CD34 auf kleinen Gefäßendothelzellen. Interessant war jedoch die Überschneidung von CD90 bzw. CD34 mit HEA125, was auf einen undifferenzierten Zustand eines Teils der vorhandenen cholangiozytären Zellen hinweist. Eventuell könnte dies auch die Erklärung für die Überschneidung von HEA125-positiven Zellen mit CD45 sein.

4.4 Isolation von CD90+ Zellen

Um einen möglichst umfassenden Pool von Vorläuferzellen zu isolieren, sollte aus den hematopoietischen Markern derjenige Marker ausgewählt werden, bei dem die Überschneidung mit den jeweils anderen Markern am größten war. Bei der graphischen Darstellung der Doppelfärbungen der einzelnen hematopoietischen Subpopulationen wurde deutlich, dass diese Bedingung am besten in der CD90-positiven Fraktion erfüllt war. Da sich bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Zusammensetzung der isolierten nichtparenchymalen Fraktionen die CD90-Population außerdem als die größte der hematopoietischen Zellpopulationen herausstellte, wurde für die vorliegende Arbeit dieser Marker für die Isolation einer möglichen Vorläuferzellpopulation verwendet. Die Isolation dieser Zellen erfolgte zudem aus der gesamten nichtparenchymalen Zellpopulation, um eine möglichst große Population aus Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen zu gewinnen.

Die Isolation von CD90+ Zellen wurde mit Hilfe magnetisch gekoppelter Sekundärantikörper durchgeführt. Zur Standardisierung des Isolationsverfahrens und um einen besseren Vergleich zwischen den einzelnen Isolationen zu ermöglichen, wurde bei jeder Isolation die gleiche Ausgangszellmenge eingesetzt. Die Ausbeute an CD90-positiven Zellen betrug dabei $1,45\% \pm 0,86\%$ der NPC-Fraktion. Diese Ausbeute lag bedeutend unter dem vorher in durchflusszytometrischen Färbungen ermittelten Anteil an CD90-positiven Zellen von knapp 10%. Eine Erklärung hierfür sind wiederum die Verluste an Zellen, die während der Lagerung der nichtparenchymalen Fraktion auftraten.

Ein Zusammenhang zwischen Ausbeute und Qualität des Gewebes wurde bei der Isolation von CD90+ Zellen nicht untersucht. Zum einen, weil bereits bei der Isolation der nichtparenchymalen Zellfraktion gezeigt werden konnte, dass sich keine dieser Erkrankungen auf die Zellausbeute auswirkt. Zum anderen, da die Isolation von CD90-positiven Zellen nicht aus Gewebe sondern aus Zellsuspensionen erfolgte und zudem durch die Verwendung der immer gleichen Ausgangszellzahl an nichtparenchymalen Zellen standardisiert wurde. Interessant war jedoch, ob eine durch die Erkrankung des Patienten erfolgte Aktivierung der Leberregeneration eine Zunahme der Ausbeute an CD90-positiven Zellen bewirkte. Aufgrund der histologischen Beurteilung des verwendeten Gewebes wurde eine Einteilung des Gewebes in regeneratives (Fibrose, hepatische Tumoren) und nicht-regeneratives (Lebermetastasen von nicht-hepatischen Tumoren) Gewebe vorgenommen und die daraus erfolgten Ausbeuten an CD90-positiven Zellen statistisch ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass aus regenerativem Gewebe signifikant mehr Zellen isoliert werden konnten, als dies aus nicht-regenerativem Gewebe der Fall war. Durch die Aktivierung einer regenerativen Antwort in der Leber wird also die Anzahl an CD90-Zellen erhöht, was auf eine Beteiligung der CD90-Zellen an der Leberregeneration schließen lässt.

4.5 Charakterisierung der CD90+ Zellen

Da CD90 ebenso wie CD34 und CD117 nicht ausschließlich auf Vorläuferzellen zu finden ist, wurde zur näheren Charakterisierung der erhaltenen Zellpopulationen eine Reihe weiterer Marker herangezogen. Es wurden dabei Marker gewählt, die in unterschiedlichen Differenzierungsstadien auf Leberzellen exprimiert werden, um dadurch genauere Informationen über die Zusammensetzung der Population zu erhalten. Zusätzlich zu den bereits in den immunhistochemischen Färbungen eingesetzten Markern wurden noch AFP, Chromogranin A und Nestin verwendet.

Alpha-Fetoprotein (AFP) ist der mit am häufigsten zur Identifizierung von Vorläuferzellen in der Leber verwendete Marker. AFP wird in embryonalem Gewebe bereits vor der Bildung der Leber exprimiert und signalisiert in endodermalen Zellen ihre Determinierung in Richtung von Leberzellen¹⁶⁵. Im Lauf der Zelldifferenzierung verschwindet die AFP-Expression, auf reifen Leberzellen kann dieser Marker nicht

nachgewiesen werden. Sowohl im Tiermodell als auch an menschlichem Lebergewebe konnte ein erneutes Auftreten von AFP auf hepatischen Vorläuferzellen beobachtet werden^{166,167}.

Bei Chromogranin A handelt es sich um ein Molekül, das in der Matrix von neuroendokrinen Granula auftritt und vermutlich eine Rolle beim Prozessieren von Hormonen und Neuropeptiden spielt¹⁶⁸. In normaler humaner Leber konnte dieses Molekül bisher nicht nachgewiesen werden¹⁶⁹, jedoch konnte beim Menschen in regenerierenden Lebern eine Expression von Chromogranin A auf hepatischen Vorläuferzellen, reaktiven Ductuli und vereinzelten Clustern von periportalen Hepatozyten gezeigt werden^{170,171}.

Ein weiterer neuroendokriner Marker, der mit hepatischen Vorläuferzellen in Verbindung gebracht wird, ist Nestin. Nestin wurde sowohl in fetalen hepatischen Stammzellen nachgewiesen¹⁷², als auch als Marker in Bereichen der Regeneration in adultem Gewebe¹⁷³.

Fast alle untersuchten Fraktionen zeigten eine Expression von Nestin bzw. Chromogranin A (jeweils 23 von 27 Fraktionen), enthielten also deutliche Anteile an unreifen Zellen. Auch der Anteil an CK18 (25 von 27 Fraktionen) und CK19 (23 von 27 Fraktionen) war sehr hoch. Beide Marker werden sowohl auf reifen Hepatozyten (CK18) und Gallengangszellen (CK18 und CK19) exprimiert, als auch auf unreifen Zellen. Bei den isolierten Zellpopulationen handelte es sich jedoch hauptsächlich unreife Zellen. Einerseits konnte nämlich in keiner der Isolationen eine Expression von CK7 nachgewiesen werden, was auf die Anwesenheit von reifen Gallengangszellen hinweisen würde. Und andererseits wurde auch nur in vereinzelten Fällen eine Expression von Albumin beobachtet, was sowohl durch unreife Zellen mit hepatozytärer Entwicklungsrichtung als auch durch eine Verunreinigung der Zellfraktionen mit reifen Hepatozyten verursacht werden könnte.

Im Gegensatz zu bisher in der Literatur beschriebenen Isolationen von möglichen Vorläuferzellen zeigten die hier isolierten Zellen bei keiner der Isolationen eine Expression von AFP, während eine Expression von CK14 bei allen Zellen nachzuweisen war. Eine mögliche Erklärung dafür liefern die Studien von Thorgeirsson (1993), der zeigen konnte, dass durch eine unterschiedliche Expression von CK14 und AFP offensichtlich unterschiedliche Differenzierungsstadien der Zellen angezeigt werden¹⁷⁴. Bei der oval cell Antwort im AAF/PH Modell exprimierten die neuen Zellen am Anfang CK14, aber kein AFP. Aus diesen Zellen entstanden zwei proliferierende oval

cell Populationen, von denen eine Population nur CK14 exprimierte und die andere CK14 und AFP. Die Population, die sowohl eine CK14, als auch eine AFP-Expression zeigt, scheint also bereits in Richtung hepatozytärer Differenzierung festgelegt zu sein, während die erste Population (nur CK14 Expression) eine multipotente Vorläuferpopulation darstellen könnte. Ebenso wurde in weiteren Studien an erkranktem Gewebe ein verstärkter Zusammenhang zwischen der AFP-Expression in adultem Gewebe und einer malignen Entartung der Zellen festgestellt, während auf regenerierenden Leberzellen die AFP-Expression eher schwach war^{175,176}.

Aus diesem Grund wurde CK14 als Kombinationsmarker für Doppelfärbungen eingesetzt. Da es sich bei diesen Zellen auf jeden Fall um Vorläuferzellen in einem sehr frühen Differenzierungsstadium handeln sollte, konnte auf diese Weise nachgewiesen werden, in wieweit die durch PCR nachgewiesenen weiteren Vorläufermarker und die hepatischen Differenzierungsmarker bereits auf dieser frühen Population zu finden sind. Für alle Kombinationen konnten Zellen gefunden werden, die jeweils positiv für beide der untersuchten Marker waren. Bei den isolierten Zellpopulationen handelte es sich also hauptsächlich um heterogene Zellpopulationen mit unreifen Zellen unterschiedlicher Reifungsgrade, während Verunreinigungen durch ausdifferenzierte Zellen äußerst gering waren.

4.6 Zellkultur von CD90+ Zellen

Für die Zellkultur der gewonnenen CD90-positiven Zellfraktionen wurden zunächst unbeschichtete Zellkulturplatten und eine Medienzusammensetzung, die für die Kultur von vielen Zelllinien verwendet wird, gewählt. Wegen der schlechten Adhäsion der Zellen in diesem Modell wurde für die weiteren Versuche die bereits für die Kultivierung von humanen Hepatozyten erfolgreich eingesetzte single gel Kultur auf einer Kollagenmatrix eingesetzt. Für die Wahl dieser Matrix spricht die Tatsache, dass auch in der Leber selbst eine Kollagenmatrix vorliegt, die dort von den Ito-Zellen gebildet wird. Die gewählten Medien entsprechen Zusammensetzungen, die zum einen bereits für die Kultur von humanen Gallengangszellen verwendet wurden¹⁷⁷ und zum anderen zur Kultur von multipotenten adulten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und zur Differenzierung dieser Zellen zu Hepatocyten eingesetzt wurden¹⁷⁸.

Bei der Kultivierung der Zellen zeigten diese nach einer kurzen Adhäsionszeit zunächst klonales Wachstum und bildeten nach längerer Kulturdauer einen geschlossenen Zellrasen. Jedoch konnten nur sechs von 17 Zellpräparationen auf den unbeschichteten Zellkulturplatten kultiviert werden. Auf der Kollagenmatrix adhärierten fünf von sieben Zellpräparationen in Versuchsreihe II und drei von sieben in Versuchsreihe III. Bei den übrigen Isolationen konnte keine Adhäsion der Zellen erreicht werden.

Nach 14 bzw. 28 Tagen Kulturdauer wurden die Zellen mittels PCR wiederum auf die Expression von Vorläufermarkern (AFP, Chromogranin A, Nestin, CK14) und Differenzierungsmarkern (Albumin, CK18, CK19, CK7) untersucht. Bei den Vorläufermarkern trat bei CK14 und Nestin eine Verringerung der Expression auf, während die Expression von Chrom A anstieg. Dagegen zeigte die Expression der Differenzierungsmarker eine z.T. deutliche Zunahme. Am auffälligsten war die beginnende Expression von CK7, die in allen erfolgreich kultivierten Zellpräparationen nachgewiesen werden konnte. Obwohl CK7 auch als Marker für undifferenzierte Zellen in einem sehr frühen Differenzierungsstadium beschrieben wurde¹⁷⁹, zeigt sein Auftreten im Verlauf der Kultur eine beginnende Differenzierung der Zellen. Dafür spricht auch die Abnahme der Expression von CK14 und die Zunahme von Chrom A während der Kultur, da es sich bei CK14 um einen Marker für undifferenzierte Zellen handelt¹⁸⁰, während Chrom A auf Zellen in einem späteren Differenzierungsstadium exprimiert wird¹⁸¹. Jedoch handelt es sich bei den Zellen auch am Ende der 28-tägigen Kultur noch um nicht vollständig differenzierte Zellen. Zum einen, da die Expression von CK14 zwar abnimmt, aber nicht völlig verschwindet, zum anderen, da in immunhistochemischen Färbungen sowohl CK7 als auch HepPar1 auf den Zellen nachgewiesen werden konnte, während auf vollständig differenzierten Zellen nur jeweils einer dieser beiden Marker zu finden wäre.

Das von der CD90-Population exprimierte Markerspektrum weist darauf hin, dass es sich bei der isolierten Zellpopulation um eine Vorläuferpopulation der adulten Leber handelt. Vor allem die signifikante Zunahme dieser Zellen in regenerativem Gewebe zeigt ihre Beteiligung an der Regeneration der Leber. Mit dem entwickelten Protokoll ist eine Isolation in gleichbleibender Qualität aus Leberzellresektaten möglich, die Zellen können in Zellkultur expandiert werden. Durch weitere Isolationen dieser Zellen, ihre Anreicherung durch Zellkultur und eine längerfristige Lagerung durch Kryo-

konservierung können genügend Zellen bereit gestellt werden, um im Tiermodell zu untersuchen, ob diese Zellen in der Lage sind, nach Zelltransplantation durch funktionelle Integration und Differenzierung zur Regeneration geschädigter Lebern beizutragen.

4.7 Hepatische Vorläuferzellen als Lebertherapeutikum

Jährlich sterben alleine in Deutschland etwa 20000 Menschen an Leberversagen¹⁸². Das Leberversagen kann ohne vorbestehende Lebererkrankung erfolgen (akutes Leberversagen) oder im Verlauf einer chronischen Lebererkrankung (chronisches Leberversagen) auftreten. In beiden Fällen ist die zurzeit erfolgreichste Therapiemaßnahme die Lebertransplantation. Neben der Problematik der Abstoßung von transplantierten Organen und der Nebenwirkungen durch die Immunsuppression besteht jedoch das Hauptproblem der Lebertransplantation in der viel zu geringen Zahl an vorhandenen Spenderorganen, so dass der notwendige Eingriff nicht oder nicht rechtzeitig erfolgen kann. Es besteht daher der Bedarf an unterstützenden Maßnahmen, mit denen entweder die Wartezeit bis zur Transplantation überbrückt werden kann („bridging-to-transplantation“) bzw. die zur Regeneration der erkrankten Leber beitragen können („bridging-to-regeneration“). Derzeit befinden sich drei derartige Leberunterstützungssysteme in der klinisch-experimentellen Erprobung. Es handelt sich dabei zum einen um verschiedene extrakorporale maschinelle und bioartifizielle Leberersatzverfahren, zum anderen um die Transplantation von Leberzellen. Während mit den artifiziellen Verfahren das Blut der Patienten in einer Art Dialyse von toxischen Substanzen gereinigt wird, sollen durch die bioartifiziellen Verfahren und die Leberzelltransplantation die regulativen Prozesse der Leber und die Synthese lebenswichtiger Substanzen unterstützt bzw. wiederhergestellt werden¹⁸³.

Ein wesentliches Problem sowohl beim Einsatz von bioartifiziellen Leberunterstützungssystemen als auch bei der Zelltransplantation ist die Bereitstellung von Leberzellen in ausreichender Anzahl. Primäre humane Hepatozyten müssen aus Leberresektaten oder aus Leberexplantaten, die nicht für die Transplantation geeignet sind, gewonnen werden, damit diese Leberunterstützungssysteme keine Konkurrenz zur Lebertransplantation darstellen. Dadurch sind die Menge und die Qualität der isolier-

ten Zellen eingeschränkt. Eine Vermehrung der gewonnenen Zellen durch Zellkultur ist jedoch leider nicht möglich. Zwar können primäre humane Hepatozyten in Zellkultur ihre Funktionalität über einen relativ langen Zeitraum erhalten¹⁸⁴, bisher konnte aber keine Expansion dieser Zellen in Kultur erreicht werden. Auch der Einsatz von hepatischen Zelllinien für die extrakorporalen Systeme ist nicht ganz unproblematisch. Zum einen haben Zelllinien bereits einen Teil ihrer metabolischen Aktivität verloren, zum anderen besteht die Gefahr, dass diese Zellen in den Blutkreislauf des Patienten gelangen und das Wachstum von Tumoren verursachen. Die Verwendung von tierischen Hepatozyten wird dadurch eingeschränkt, dass sich die metabolische Aktivität dieser Zellen z.T. erheblich von humanen Hepatozyten unterscheidet und zudem die Gefahr der Übertragung von viralen Infektionen besteht¹⁸⁵.

Durch die Isolation von hepatischen Vorläuferzellen und die Expansion dieser Zellen in möglichst undifferenzierterem Zustand wäre es möglich, Zellen in größerer Anzahl und gleichbleibender Qualität zur Verfügung zu stellen. Derartige Populationen könnten sowohl als „Grundbaustein“ für die Bildung einer bioartifiziellen Leber genutzt werden, als auch direkt für die Zelltherapie eingesetzt werden.

Der eindeutige Nachteil bei der Verwendung derartiger Zellpopulationen besteht darin, dass Vorläuferzellpopulationen immer auch die Gefahr der Tumorentstehung in sich bergen. Sowohl Stammzellen als auch Tumorzellen sind in der Lage, beinahe unbegrenzt neue Zellen hervorzubringen und sich selbst zu erneuern. Außerdem weisen diese Zellen starke Gemeinsamkeiten bezüglich der von ihnen exprimierten Marker auf, während sich die Markerexpression von differenzierten Zellen stark davon unterscheidet¹⁸⁶. Die in dieser Arbeit untersuchten und isolierten CD90-Populationen zeigten eine signifikante Zunahme der Zellzahl in regenerativem Gewebe. Dadurch wird einerseits ihre Bedeutung für die Leberregeneration deutlich, andererseits weist aber dieser Zusammenhang der Zellzahl mit verschiedenen Erkrankungen der Leber und das hohe Proliferationspotential der Zellen in Zellkultur auch auf ihr Potential zur Tumorbildung hin. Auch die Marker, die zur Charakterisierung der Vorläufereigenschaften der isolierten CD90-Population verwendet wurden, können ebenso auf Lebertumoren nachgewiesen werden. Generell wird jedoch die Gefahr der Tumorbildung, die von adulten Vorläuferzellen ausgeht, als bedeutend niedriger eingestuft, als dies bei embryonalen Stammzellen der Fall ist. Bei der Transplantation von undifferenzierten embryonalen Stammzellen im Tiermodell konnte regelmäßig die Entstehung von Teratomen beobachtet werden, während durch die

vollständige Entfernung von undifferenzierten Zellen aus den zur Transplantation vorgesehenen Populationen die Tumorentstehung verhindert werden konnte¹⁸⁷. Bei der Transplantation von frisch isolierten adulten Vorläuferzellen, einem Verfahren, das z.B. bei der Therapie von bestimmten Leukämien und Lymphomen bereits seit 40 Jahren erfolgreich eingesetzt wird, konnte bisher kein Zusammenhang der Zelltransplantation mit der Entstehung von Tumoren beobachtet werden. Jedoch können transplantierte adulte Stammzellen das Wachstum bereits bestehender Tumoren beschleunigen. Auch zu lange Kulturdauern (mehr als 60 Passagen) erhöhen sowohl bei embryonalen als auch adulten Stammzellen das Risiko der genetischen Entartung der Zellen¹⁸⁸.

Durch die Verwendung von frisch isolierten, kryokonservierten bzw. nur für wenige Passagen kultivierten adulten Vorläuferzellen für Leberzelltransplantationen könnte also das Risiko der Tumorbildung minimiert werden. Bei längeren Kulturdauern muss vor der Verwendung dieser Zellen als Therapeutikum zusätzlich das krebszeugende Potential durch eine Überprüfung auf Modifikationen im Erbgut ausgeschlossen werden.

5 Zusammenfassung

Der Einsatz von Stammzellen als Therapeutikum stellt eine sehr elegante Therapiemaßnahme dar und ist in vielen Fällen auch die einzige längerfristig wirksame Maßnahme. Auch in der Leber gibt es verschiedene Erkrankungen, bei denen mit Hilfe von Stammzellen die Überlebensaussichten und die Lebensqualität der Patienten gesteigert werden könnte. Das Vorhandensein von hepatischen Vorläuferzellen wurde sowohl in Tiermodellen als auch beim Menschen bereits mehrfach nachgewiesen. Es wurde eine Reihe von Markern beschrieben, von denen einige für eine gezielte Isolation der Zellen genutzt werden könnten.

Zur genauen Charakterisierung und Identifizierung der verschiedenen Leberzelltypen und möglicher Vorläuferpopulationen durch immuhistochemische Färbungen und PCR wurde zunächst ein geeignetes Markerpanel zusammengestellt. Die Evaluierung der Antikörper erfolgte durch Färbungen an Gewebeschnitten und durch PCR an einer hepatozytären Karzinomzelllinie (HepG2) und Zellen aus einem cholangionzellulären Karzinom. Neben Markern für die eindeutige Identifizierung der einzelnen Zelltypen der Leber (Albumin, CK18, HepPar-1, CK7, CK19, HEA125, CD31, CD68, SMA- α) enthielt das Markerpanel auch eine Reihe von hepatischen (AFP, CK14, OV6, M2-PK) und hematopoietischen Vorläufermarkern (CD34, CD90, CD117, CD45).

Zur Isolation von nichtparenchymalen Zellfraktionen aus humanen Leberzellresektaten wurde auf der Basis eines bereits existierenden Protokolls ein Verfahren etabliert, um in möglichst standardisierter Weise geeignete Zellen zu gewinnen. Dafür wurden im ersten Schritt die Hepatozyten durch eine EGTA/Collagenase-Perfusion abgetrennt. Im nächsten Schritt erfolgte der vollständige Verdau des Restgewebes durch eine Enzymlösung aus Collagenase, Pronase und DNase. Durch eine abschließende Reinigung durch eine Percoll-Dichtezentrifugation konnten Verunreinigungen durch Hepatozyten, Erythrozyten und toten Zellen abgetrennt werden und Populationen von vitalen Zellen gewonnen werden, deren Zelldurchmesser im Größenbereich von 5-15 μm lag. Sowohl der erhaltene Größenbereich der Zellen als auch die positive

Färbung der Fraktionen auf CD68 und HEA125 zeigten, dass es sich bei diesen Zellfraktionen um die nichtparenchymalen Zellen der Leber handelte.

Mit der beschriebenen Methode wurden Zellen aus insgesamt 65 Leberzellresektaten isoliert. Die durchschnittliche Zellausbeute betrug dabei $2,7 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$ /g Resektatgewebe bei einer Vitalität der isolierten Zellen von $82,9\% \pm 9,2\%$. Ein Vergleich der Zellausbeuten aus Gewebe mit unterschiedlichen Erkrankungen (Cholestase, Fibrose, Zirrhose, Entzündung und Verfettung des Gewebes) zeigte, dass eine grundliegende Erkrankung des Ausgangsgewebes keinen Einfluss auf die Ausbeute an nichtparenchymalen Zellen hatte. Durch eine durchflusszytometrische Charakterisierung der Zellpopulationen mit verschiedenen Leberzellmarkern (HEA125, CD31) und hematopoietischen Vorläufermarkern (CD34, CD45, CD90, CD117) wurde die Zusammensetzung an den einzelnen nichtparenchymalen Subpopulationen und der Anteil an möglichen Vorläuferpopulationen ermittelt. Doppelfärbungen der hematopoietischen Populationen zeigten deutliche Überschneidungen der einzelnen hematopoietischen Marker. Trotz des hohen Anteils an hematopoietischen Zellen konnte jedoch in der nichtparenchymalen Zellfraktion in CFU-Assays kein hematopoietisches Potential festgestellt werden.

Da sich bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung der nichtparenchymalen Zellfraktionen zeigte, dass die CD90-Population die größte der hematopoietischen Fraktionen darstellte und zudem die Koexpression dieses Markers mit den beiden anderen untersuchten hematopoietischen Markern CD34 und CD117 am stärksten war, wurde für die weitere Anreicherung von möglichen Vorläuferpopulationen dieser Marker verwendet. Die Isolation erfolgte mit Hilfe immunmagnetischer Markierung und Reinigung aus einer immer gleichen Ausgangszellzahl von nichtparenchymalen Zellen. Die dabei erhaltenen Zellausbeuten lagen bei $6,85 \times 10^5 \pm 4,42 \times 10^5$ Zellen / Isolation, was einem Anteil von $1,45\% \pm 0,86\%$ der NPC-Fraktion entsprach. Ein Vergleich der Ausbeuten aus regenerativem (Fibrose, hepatische Tumoren) und nicht-regenerativem (Lebermetastasen von nicht-hepatischen Tumoren) Gewebe zeigte, dass aus regenerativem Gewebe signifikant mehr CD90-Zellen isoliert werden konnten, als aus nicht-regenerativem Gewebe.

Ebenso wie die nichtparenchymalen Ausgangsfraktionen wurden auch die CD90-Populationen mittels PCR und IHC auf die Expression von sowohl hepatischen Differenzierungsmarkern (Albumin, CK7, CK18, CK19, HepPar1) als auch hepatischen (AFP, Chromogranin A, CK14, Nestin, OV6, M2-PK) und hematopoietischen (CD34, CD117) Vorläufermarkern überprüft. Während in keiner der untersuchten Fraktionen eine Expression von AFP und CK7 nachgewiesen werden konnte und Albumin nur in einigen Fraktionen exprimiert wurde, waren fast alle Fraktionen positiv für die Differenzierungsmarker CK18 und CK19 und die Vorläufermarker Nestin, Chromogranin A und CK14. Der Anteil an OV6, CK14 und M2-PK innerhalb einer Zellfraktion belief sich auf ca. 60% der Zellen. Immunhistochemische Doppelfärbungen von CK14 als Marker für undifferenzierte Leberzellen mit hematopoietischen (CD34, CD117) und hepatischen (OV6, M2-PK) Vorläufermarkern und hepatischen Differenzierungsmarkern (CK19, HepPar1) zeigte bei allen Färbungen Zellen, die positiv für beide Marker waren.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte sowohl auf unbeschichteten als auch auf Kollagen-beschichteten Zellkulturplatten mit verschiedenen Medienzusammensetzungen, die bereits erfolgreich für die Kultur von Vorläuferzellen eingesetzt wurden. Bei 15 von 31 Ansätzen konnte eine Adhäsion der Zellen erreicht werden. Die Zellen zeigten zunächst klonales Wachstum und bildeten innerhalb einer Kulturdauer von 28 Tagen einen geschlossenen Zellrasen. Nach 14 bzw. 28 Tagen wurden die Zellen mittels PCR und IHC auf die Expression von Vorläufermarkern (Nestin, Chromogranin A, CK14) und Differenzierungsmarkern (Albumin, CK18, CK19, CK7, HepPar1) untersucht. Während bei den Differenzierungsmarkern eine Zunahme nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression der Vorläufermarker im Verlauf der Kultur schwächer, was auf eine beginnende, jedoch nicht vollständige Differenzierung der Zellen hinweist.

In dieser Arbeit ist es gelungen, eine Vorläuferzellpopulation der Leber zu identifizieren, zu isolieren und in nicht-differenzierter Form in Zellkultur zu expandieren. Damit wurde eine entscheidende Grundlage geschaffen, durch Kultur und Kryokonservierung dieser Zellen ausreichende Zellzahlen für ihre weitere Charakterisierung in experimentellen Transplantationen zur Verfügung zu stellen.

6 Experimenteller Teil

6.1 Allgemeine Angaben

6.1.1 Geräte

Analysenwaage HR-200 (A&D Instruments Ltd, Ahrensburg)

Begasungsbrutschrank Heraeus BB6220 (Heraeus Holding GmbH, Hanau)

CCD Camera KP-M2U (Hitachi Densi, Düsseldorf)

Cell Counter Casy® 1 Model TTC (Schärfe System, Reutlingen)

Cryostat (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)

Digitalkamera Colour View 12 (Olympus, Hamburg)

Durchflusszytometer FACSCalibur (BD Biosciences, Heidelberg)

Inverses Mikroskop Leica DMIL (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)

Laminar-Flow Sicherheitswerkbank LaminAir® HB2427 (Heraeus Holding GmbH, Hanau)

pH-Meter 766 Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte GmbH&Co, Berlin)

Reinstwasseranlage Millipore Milli-Q Biocell (Millipore GmbH, Schwalbach)

Schüttelwasserbad GFL 1092 (GFL, Burgwedel)

Thermo Cycler PTC-200 (MJ Research, Inc., Waltham USA)

Thermomixer compact (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf)

Tischzentrifuge Eppendorf 5417C (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf)

Universalzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R (Heraeus Holding GmbH, Hanau)

UV-Leuchtschirm TFX-20.M (MWG Biotech, Ebersberg)

UV / VIS Spektrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia Biosystems)

Zytozentrifuge Universal 16 A + Zyro-Rotor (Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen)

6.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a. Qualität.

peqGOLD Universal-Agarose	peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen
Aquatex®	Merck KgaA, Darmstadt
Ascorbinsäure-2-Phosphat	Merck KgaA, Darmstadt
Bisbenzimid H33258	AppliChem GmbH, Darmstadt
BSA	Biomol GmbH, Hamburg
Choleratoxin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dexamethason	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMEM	Biochrom AG, Berlin
DMEM/Ham's F12	Biochrom AG, Berlin
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
10x EBSS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
EGF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Ethidiumbromid	Merck KgaA, Darmstadt
Fast Red	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
FCS	Biochrom AG, Berlin
Fluorescent Mounting Medium	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hematoxylin QS	Vector Laboratories, Peterborough, England
HGF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Hydrocortison	Rotexmedica GmbH, Trittau
Insuman Rapid	Aventis Pharma, Frankfurt/Main
ITS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Iscoves Modified Dulbeccos Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Linolsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MethoCult® GF H4434	StemCell Technologies, Inc, Vancouver, Kanada
Milchpulver	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Nicotinamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraformaldehyd (37%)	Merck KgaA, Darmstadt

D-PBS	Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Biochrom AG, Berlin
Percoll™	Amersham Biosciences Europe, Freiburg
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RLT Puffer	Qiagen GmbH, Hilden
Streptomycin	Merck KgaA, Darmstadt
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Germany, Heppenheim
Triiodothyronin	Merck KgaA, Darmstadt
Triton X-100	Merck KgaA, Darmstadt
William's E Medium	Biochrom AG, Berlin

6.1.3 Materialien

BD Biocoat Collagen, 24 well	BD Biosciences Europe, Heidelberg
FACS-Röhrchen	BD Biosciences Europe, Heidelberg
MACS LS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
MACS Magnet	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Objektträger SuperFrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Siebgewebe aus Polyamid	neoLab, Heidelberg
Porengröße 70 µm	
Porengröße 210 µm	
Zellfilter 40 µm	BD Biosciences Europe, Heidelberg

6.1.4 Lösungen und Puffer

6x Gelauftragspuffer

60% Glycerin
60 mM EDTA (pH 8.0)
0,03% Bromphenolblau
10 mM Tris·Cl (pH 7.6)

MACS-Puffer

D-PBS mit
2 mM EDTA
5 g/l BSA

20× PBS (für Immunhistochemie)

2,74 M NaCl
53,7 mM KCl
29,4 mM KH₂PO₄
159,5 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O

PBS/EDTA

D-PBS mit
2 mM EDTA

Percoll-Gradient (1,09 g/ml)¹⁸⁹

63% Percoll
7% 10x EBSS
30% D-PBS

Perfusionspuffer (PP)

154 mM NaCl
5,6 mM KCl
5 mM Glucose · H₂O
25 mM NaHCO₃
20 mM HEPES
pH 7,4

Propidiumiodid (PI)-Puffer (FACS)

D-PBS mit
1 µg/ml Propidiumiodid
1 µg/ml RNase A

Puffer für Gewebeverdau

PP mit
0,5 mg/ml Collagenase A
0,5 mg/ml Pronase
5 mM CaCl₂
1 mM MgCl₂
40 µg/ml DNase I

TBE-Puffer

89 mM Tris Base
89 mM Borsäure
20 mM EDTA (pH 8.0)
7.5 g/l Glycin

6.1.5 Zellkulturmedien

Alle verwendeten Medien enthielten 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin.

Versuchsreihe I:

Adhärenzmedium I / Kulturmedium I

DMEM mit
10% FCS
2 mM L-Glutamin

Versuchsreihe II^{190,191}:

Adhärenzmedium II

DMEM mit
10% FCS
2 mM L-Glutamin

Kulturmedium II

DMEM/Ham's F12 (1:1) mit
5% FCS
5 µg/ml Insulin
10 ng/ml EGF
10 ng/ml Choleratoxin
0,4 µg/ml Hydrocortison
2 nM Triiodothyronin
100 ng/ml HGF

Versuchsreihe III¹⁹²:

Adhärentzmedium III

William's E Medium mit
5% FCS
10 mM Nicotinamid
20 mM HEPES
17 mM NaHCO₃
550 mg/l Natriumpyruvat
0,2 mM Ascorbinsäure-2-Phosphat
14 mM Glucose
10⁻⁷ M Dexamethason
2 mM L-Glutamin
ITS (6,25 µg/ml Insulin / 6,25 µg/ml Transferrin / 6,25 ng/ml Natrium-selenit)
1,25 mg/ml BSA
5,35 µg/ml Linolsäure

Kulturmedium III

Adhärentzmedium III ohne FCS
20 ng/ml EGF

6.1.6 Enzyme

APAAP Maus, monoklonal	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Collagenase Typ IV	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pronase® Protease	Calbiochem, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden
RNase A (100 mg/ml)	Qiagen GmbH, Hilden
Taq DNA Polymerase, rekombinant	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

6.1.7 Zelllinien

HepG2¹⁹³

(Homo sapiens)

hepatozytäre Karzinomzelllinie

6.1.8 Molekularbiologische Systeme

Qiagen RNeasy Mini Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Kat.-Nr.: 74104

Promega Reverse Transcription System

Promega GmbH, Mannheim

Kat.-Nr.: A3500

6.1.9 Antikörper

6.1.9.1 Antikörper und Isotypkontrollen für die Immunhistochemie

Antigen	Spezies	Isotyp / Klon	Verdünnung	Firma	Katalog-Nummer
Albumin	Maus	IgG1 / ZMHS A1	1:200	Zymed	03-0700
CD31	Maus	IgG1 / JC70A	1:100	Dako	M 0823
CD34	Maus	IgG1 / QBend10	1:100	Dako	M 7165
CD68	Maus	IgG1 / EBM11	1:50	Dako	M 0718
CD90 (Thy-1)	Maus	IgG1 / 5E10	1:250	BD Pharmingen	555593
CD117 (c-kit)	Maus	IgG2a / K45	1:100	NeoMarkers	MS-289
CK7	Maus	IgG1 / OV-TL 12/30	1:100	Dako	M7018
CK14	Kaninchen	IgG / polyklonal	1:50	Zytomed GmbH	RP 113
CK18	Maus	IgG1 / CK2	1:100	Chemikon	MAB3404
CK19	Maus	IgG1 / RCK108	1:100	Dako	M 0888
Ep-CAM	Maus	IgG1 / HEA-125	1:100	Progen	61004
HepPar1	Maus	IgG1 / OCH1E5	1:50	Dako	M 7158
M2-PK	Maus	IgG1 / DF4	1:10	ScheBo® Biotech AG	S-1
OV6	Maus		1:100	S. Sell	
SMA- α	Maus	IgG2a / 1A4	1:100	Dako	M0851
Anti-Maus	Kaninchen	IgG / polyklonal	1:25	Dako	Z 0259
Anti-Kaninchen	Maus	IgG / MR12/53	1:25	Dako	M 0737
Anti-Maus-FITC	Esel	IgG / polyklonal	1:200	Jackson ImmunoResearch	715-096-150
Anti-Kaninchen-TR	Esel	IgG / polyklonal	1:250	Jackson ImmunoResearch	711-076-152
Isotypkontrolle	Maus	IgG1 / MOPC21	1:50	Sigma	M 9269
Isotypkontrolle	Maus	IgG2a / DAK-GO5	1:50	Dako	X 0943
Isotypkontrolle	Kaninchen	IgG / polyklonal	1:2000	Sigma	I5006

6.1.9.2 Antikörper und Isotypkontrollen für die Durchflußzytometrie

Antigen	Spezies	Isotyp / Klon	Verdünnung	Firma	Katalog-Nummer
CD31-PE	Maus	IgG1 / WM-59	20 µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmin-gen	555446
CD34-FITC	Maus	IgG1 / 8G12	20 µl/10 ⁶ Zellen	BD	345801
CD34-PE	Maus	IgG1 / 8G12	20 µl/10 ⁶ Zellen	BD	345802
CD45-FITC	Maus	IgG1 / 2D1	10 µl/10 ⁶ Zellen	BD	345808
CD45-PE	Maus	IgG1 / HI30	10 µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmin-gen	555483
CD90-PE	Maus	IgG1 / 5E10	5 µl/10 ⁶ Zellen	BD Pharmin-gen	555596
CD117-PE	Maus	IgG1 / 104D2	10 µl/10 ⁶ Zellen	Southern Biotech	9815-09C
Ep-CAM-FITC	Maus	IgG1 / HEA125	10 µl/10 ⁶ Zellen	Progen	61404
Isotypkontrolle-FITC	Maus	IgG1 / X40	10 µl/10 ⁶ Zellen	BD	345815
Isotypkontrolle-PE	Maus	IgG1 / X40	10 µl/10 ⁶ Zellen	BD	345816
Anti-Maus-FITC	Kaninchen	IgG / polyklonal	10 µl/Ansatz	DAKO	F0313

6.1.9.3 Antikörper für die immunomagnetische Isolation von Zellen

Goat anti-mouse IgG MicroBeads

Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach

6.1.10 PCR-Primer

Die Konstruktion der verwendeten Primer erfolgte mit Hilfe von GeneTool lite. Die Synthese der Primer wurde von Sigma Genosys durchgeführt.

Gen	Access-Nr.	Primersequenz	
β-Actin	NM_001101	Forward	5' gccgggacctgactgactac 3'
		Reverse	5' tgcggatgtccacgtcac 3'
AFP	NM_001134	Forward	5' tgcatccaaagtgaagagggaga 3'
		Reverse	5' atagcgagcagccaaagaagaa 3'
Albumin	NM_000477	Forward	5' gctgccatggagatctgctga 3'
		Reverse	5' gcaagtcaagcaggcatctcatc 3'
Chromogranin A	NM_001275	Forward	5' cgcgcctgtctctactc 3'
		Reverse	5' aggaaagagccagaacagat 3'
CK7	NM_005556	Forward	5' tccgcgaggtcaccattaac 3'
		Reverse	5' gctgccttggccgacttct 3'
CK14	NM_000526	Forward	5' gggcggcctgtctgtctc 3'
		Reverse	5' aggccgttattgaggttctg 3'
CK18	NM_000224	Forward	5' cccgctacgccctacaga 3'
		Reverse	5' gcgggttgtggcttttg 3'
CK19	NM_002276	Forward	5' cgagcagaaccggaaggatg 3'
		Reverse	5' agccgctggtaactcctgattc 3'
Nestin	NM_006617	Forward	5' gggggcaatgaatcctctag 3'
		Reverse	5' caccgttatctcccacctctg 3'

6.1.11 Software

Die vorliegende Arbeit wurde mit Microsoft WORD 2007 geschrieben. Graphiken wurden mit ORIGIN 7.0 erstellt, graphische Zeichnungen wurden mit Microsoft POWER POINT 2007 angefertigt. Die mikroskopische Dokumentation von Bildern erfolgte mit analySIS 3.1, zur Bildbearbeitung wurde Adobe Photoshop 5.0 verwendet. Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe von GeneTool Lite 1.0 konstruiert. Die Datenaufnahme der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte mit Cell Quest™, zur Auswertung wurde WinMDI 2.8 verwendet. Berechnungen und die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgten mit Microsoft EXCEL 2007 und ORIGIN 7.0. Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte mit dem ungepaarten Sudent's t-test. Die relative optische Dichte von PCR-Banden wurde durch Scion Image bestimmt.

6.2 Methoden

Das für die vorliegende Arbeit verwendete humane Lebergewebe stammte aus chirurgischen Leberteilresektaten. Die Verwendung des Gewebes erfolgte unter Beachtung der Richtlinien der gemeinnützigen, staatlich kontrollierten Gesellschaft HTCR (Human Tissue and Cell Research)¹⁹⁴ und der Ethik-Kommission der Universität Regensburg. Die Patienten wurden vor der Operation über die Möglichkeit der Gewebe-Spende aufgeklärt und ihre Zustimmung durch einen nicht in ihre weitere Behandlung involvierten Arzt eingeholt.

Einziges Ausschlusskriterium für die Verwendung des Gewebes war eine positive Serologie für Hepatitis B und C und HIV.

6.2.1 Immunhistochemie

6.2.1.1 Vorbereiten der Präparate

6.2.1.1.1 Gefrierschnitte

Gefrierschnitte für immunhistochemische Untersuchungen wurden sowohl an Gewebe als auch an Zellpellets durchgeführt. Dafür wurden Gewebestücke mit einer Kantenlänge von maximal 0,5 cm in einem speziellen Einbettmedium (Tissue-Tek® O.C.T™ Compound) eingebettet, pelletierte Zellen wurden mit dem Einbettmedium überschichtet. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert. Von den Gewebeblöcken wurden am Cryostat Schnitte mit einer Dicke von 6 µm angefertigt und auf beschichtete Objektträger (SuperFrost® Plus) aufgezogen, von den Zellpellets wurden Schnitte mit einer Dicke von 5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden 30-60 min bei RT getrocknet und anschließend bei –80°C aufbewahrt.

6.2.1.1.2 Zytospin-Präparate

Für die Herstellung von Zytospinpräparaten wurden spezielle zylinderförmige Aufsätze verwendet, mit deren Hilfe die Zellen kreisförmig auf Objekträger zentrifugiert werden konnten. Dafür wurden die Zellen nach dem Waschen in PBS in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert und jeweils 50 µl der Zellsuspension in einer Zytozentrifuge 10 min bei 1300g auf beschichtete Objekträger (SuperFrost® Plus) zentrifugiert. Nach einer Trocknungsphase von ca. 12 h bei RT wurden die Präparate bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

6.2.1.1.3 Fixieren von kultivierten Zellen

Für die immunhistochemische Färbung von kultivierten Zellen wurde am Ende des Kulturzeitraums das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Anschließend wurde der Paraformaldehyd abgesaugt, die Zellen erneut mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

6.2.1.2 Färbeprotokolle

6.2.1.2.1 Färbung nach der APAAP-Methode

Diese Färbemethode beruht auf der enzymatischen Umsetzung von Fast Red durch das Enzym Alkalische Phosphatase. Verwendet wird hierfür ein löslicher Komplex (Alkalische Phosphatase / anti-Alkalische Phosphatase; APAAP), der über einen Brückenantikörper mit dem Primärantikörper gekoppelt wird. Primärantikörper und APAAP-Komplex müssen hierfür aus derselben Spezies stammen. Bei der Verwendung von Primärantikörpern und APAAP-Komplexen aus jeweils unterschiedlichen Spezies muss in einem zusätzlichen Färbeschritt ein geeigneter Sekundärantikörper eingefügt werden.

Tab. 6: Arbeitsschritte der immunhistochemischen Färbung nach der APAAP-Methode

Färbeschritt	Reagenz	Dauer
Fixieren der Präparate	Aceton	10 min
Blockieren unspezifischer Bindungen	PBS + 3% FCS	20 min
Inkubation mit Primärantikörper	PBS + 1% FCS	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Für CK14: Inkubation mit Sekundärantikörper	PBS + 1% FCS	30 min
Für CK14: 3× Waschen	PBS	5 min
Inkubation mit Brückenantikörper	PBS + 1% FCS	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Inkubation mit APAAP-Komplex	PBS + 1% FCS	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Inkubation mit Fast Red	0,1 M Tris·Cl; pH 8,2	10-20 min
3× Waschen	Leitungswasser	5 min
Kerngefärbung mit Hematoxylin	Hematoxylin QS	1 min
Waschen	Leitungswasser	30 s
Eindecken	Aquatex	12 h

Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Der APAAP-Komplex und die Primärantikörper stammten jeweils aus der Maus, als Brückenantikörper wurde ein Kaninchen anti-Maus Antikörper verwendet. Für die Färbung mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen CK14 wurde ein Maus anti-Kaninchen Antikörper als Sekundärantikörper eingesetzt.

6.2.1.2.2 Doppel-Fluoreszenzfärbung

Tab. 7: Arbeitsschritte der Doppel-Fluoreszenzfärbung

Färbeschritt	Reagenz	Dauer
Fixieren der Präparate	Aceton	10 min
Blockieren unspezifischer Bindungen	PBS + 3% Milchpulver + 0,1% Triton X-100	20 min
Inkubation mit 1. Primärantikörper	PBS + 3% Milchpulver + 0,1% Triton X-100	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Inkubation mit 1. Sekundärantikörper	PBS + 3% Milchpulver + 0,1% Triton X-100	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Inkubation mit 2. Primärantikörper	PBS + 3% Milchpulver + 0,1% Triton X-100	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Inkubation mit 2. Sekundärantikörper	PBS + 3% Milchpulver + 0,1% Triton X-100	30 min
3× Waschen	PBS	5 min
Kerngegenfärbung mit H33258	5 µg/ml H33258 in PBS	15 min
Eindecken	Fluorescent Mounting Medium	12 h

Zur gleichzeitigen Färbung von mehreren Antigenen wurden fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper eingesetzt. Um unspezifische Färbungen zu vermeiden, stammten die verwendeten Primärantikörper jeweils aus unterschiedlichen Spezies. Als Sekundärantikörper wurden hochaufgereinigte Antikörper verwendet, um Kreuzreaktionen mit Antigenen aus anderen Spezies zu unterbinden.

Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer durchgeführt.

6.2.2 Zellisolation

6.2.2.1 Isolation der nichtparenchymalen Zellfraktion

Die Isolation von nichtparenchymalen Zellen aus humanem Lebergewebe erfolgte durch den vollständigen Verdau des Gewebes nach einem modifizierten Protokoll nach Fabris et al¹⁹⁵.

Im ersten Schritt der Aufarbeitung erfolgte die Isolation von Hepatozyten nach einer modifizierten EGTA/Collagenase Perfusion des Gewebes¹⁹⁶. Das Restgewebe wurde unter sterilen Bedingungen mit Skalpellen zerkleinert und in einer Enzymlösung aus Collagenase/Pronase/DNase im Schüttelwasserbad inkubiert (37°C, 130 rpm). Der Verdau bestand im Normalfall aus drei Inkubationsschritten von jeweils 30 min. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurde die Zellsuspension durch einen 210 µm Nylonfilter filtriert, das verbleibende Restgewebe wurde weiter zerkleinert und wieder mit dem Filtrat vereint. Bei Bedarf konnte die Anzahl der Inkubationsschritte auf eine Gesamtinkubationszeit von bis zu 3 Stunden verlängert werden. Nach dem letzten Inkubationsschritt wurde die Suspension wieder durch einen 210 µm Nylonfilter filtriert und der Filter mit kaltem PBS/EDTA gewaschen. Das Filtrat wurde durch einen 70 µm Nylonfilter filtriert, wobei ebenfalls mit viel PBS/EDTA nachgespült wurde. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (400g, 10 min, 4°C) und das erhaltene Zellpellet noch zweimal mit PBS/EDTA gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurde das Pellet in PBS/EDTA resuspendiert und die Zellzahl mit Hilfe eines „cell counters“ (Casy®) bestimmt. Mit PBS/EDTA wurde die Suspension auf eine Zelldichte von maximal 1×10^8 Zellen/ml eingestellt. Zur Abtrennung von Erythrozyten und toten Zellen wurden 12 ml dieser Suspension über 20 ml 70% Percoll (Dichte 1,09 g/ml) geschichtet und zentrifugiert (800g, 30 min, 18°C, ungebremst). Die entstandene Zwischenschicht zwischen Percoll- und Puffer-Fraktion wurde abgenommen und dreimal mit PBS/EDTA gewaschen (300g, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

6.2.2.2 Isolation von CD90+ Zellen

Die Isolation von CD90-positiven Zellen erfolgte durch eine immunomagnetische Anreicherung dieser Zellen aus der nichtparenchymalen Zellfraktion unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen CD90 und dem MACS-System der Firma Miltenyi Biotech.

Die aus dem Gewebeverdau erhaltene nichtparenchymale Zellsuspension wurde durch einen 40 µm Zellfilter filtriert und die Zellzahl durch Auszählen in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Jeweils 5×10^7 Zellen wurden für einen Ansatz verwendet. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Falcon Röhrchen überführt und zentrifugiert (1300g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen im verbleibenden Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe des Primärantikörpers folgte ein Inkubationsschritt von 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal in MACS-Puffer gewaschen. Nach dem zweiten Waschschritt wurde wiederum der Überstand abgekippt und die Zellen im verbleibenden Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe eines speziellen, an magnetische Partikel gekoppelten Sekundärantikörpers folgte ein weiterer 30-minütiger Inkubationsschritt bei 4°C. Die Zellen wurden zweimal mit MACS-Puffer gewaschen, in 5 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf ein äquilibriertes LS-Säulchen, das in einen MACS-Magneten eingespannt war, aufgebracht. Nach dem vollständigen Einwandern der Suspension in das Säulchen wurde dieses mit 3x3 ml MACS-Puffer gewaschen. Das Säulchen wurde aus dem Magneten entfernt und auf ein 15 ml Falcon Röhrchen gesetzt. Die gereinigten Zellen wurden mit 5 ml MACS-Puffer eluiert, pelletiert (1300g, 5 min, 4°C) und in 1-2 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer.

6.2.3 Durchflusszytometrie

Für durchflusszytometrische Färbungen wurden 5×10^5 – 1×10^6 Zellen pro Färbung eingesetzt. Die Zellen wurden in FACS Röhrchen überführt und pelletiert (1300g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgekippt und die Zellen im verbleibenden Restvolumen resuspendiert. Nach der Zugabe der fluoreszenzgekoppelten Antikörper folgte ein Inkubationsschritt von 30 min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen. Bei der Gegenfärbung von toten Zellen mit Propidiumiodid folgte ein zusätzlicher Waschschritt mit PI-Puffer. Die Zellen wurden in 1 ml PBS/ 10^6 Zellen resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

6.2.4 CFU-Assays

Die CFU-Assays mit nichtparenchymalen Zellen wurden in vier verschiedenen Ansätzen mit Zellkonzentrationen von 100 / 500 / 2500 und 25000 Zellen / Ansatz durchgeführt. Nach der Zellzahlbestimmung in der Neubauer Zählkammer wurde jeweils die entsprechende Anzahl von Zellen in ein Eppendorf cup pipettiert, durch Zentrifugation (300g, 5 min) pelletiert und in 200 µl ISCOVES Medium resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurden 2,2 ml H4434 Methylzellulosemedium pipettiert, die Ansätze durch vortexen gemischt und anschließend 5 min bei RT inkubiert, um ein Entweichen von Luftblasen zu ermöglichen. Anschließend wurde jeweils 1 ml des Ansatzes in eine 20 mm Petrischale pipettiert und die Schale für 14 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Ende der Kulturzeit wurden die entstandenen Kolonien ausgezählt.

6.2.5 RNA-Isolation

6.2.5.1 Vorbereiten von kultivierten Zellen für die RNA-Isolation

Zur Gewinnung der RNA aus kultivierten Zellen wurde am Ende des jeweiligen Kulturzeitraums (14 bzw. 28 Tage) das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 350 µl RLT-Puffer überschichtet. Nach der Zugabe von 5 µl Proteinase K wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, in ein steriles Eppendorf cup überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

6.2.5.2 Isolationsprotokoll

Die Isolation von Gesamt-RNA nach dem Minipräparations-Protokoll der Firma QIAGEN beruht auf dem Prinzip der Lyse der RNA unter denaturierenden Bedingungen mit einem Guanidin-Isothiocyanat-Puffer und der selektiven Bindung der RNA unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgel-Membran.

Zellpellets (1×10^6 Zellen) wurden in 350 µl RLT-Puffer sorgfältig resuspendiert, RNA-Proben aus der Zellkultur wurden auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 70% Ethanol wurde der Ansatz auf ein Zentrifugensäulchen (RNeasy Spin Column) aufgebracht und die RNA durch Zentrifugation (8000g, 1 min) an die Säule gebunden. Nach einem Waschschnitt mit 700 µl RW1-Puffer (8000g, 1 min) folgten zwei Waschritte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer (Schritt 1: 8000g, 1 min; Schritt 2: 8000g, 2 min) und ein Trockenschritt (8000g, 1 min). Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte durch zwei Zentrifugationsschritte mit 15 µl RNase freiem Wasser (8000g, 1 min), wobei für den zweiten Zentrifugationsschritt das Eluat aus dem ersten Schritt erneut auf das Säulchen aufgetragen wurde.

6.2.5.3 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Nukleinsäure Konzentration von RNA wurde mittels UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Spektrophotometer bestimmt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Als Maß für die Reinheit der Lösung wurde zusätzlich der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gebildet, der im

Idealfall im Bereich von 1,8-2,0 liegt, während niedrigere Werte auf eine Verunreinigung durch z.B. Proteine hinweisen.

6.2.6 Polymerase Kettenreaktion

6.2.6.1 Reverse Transkription

Die Umschreibung von Poly-A RNA in cDNA erfolgte nach dem Protokoll des Reverse Transcription System der Firma Promega.

0,1 µg Gesamt RNA in 9,75 µl DEPC Wasser wurden 10 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Für den Reaktionsansatz wurden pro Reaktion in dieser Reihenfolge 4 µl 25 mM MgCl₂, 2 µl 10× Puffer, 2 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,5 µl RNasin Inhibitor, 0,75 µl AMV Reverse Transcriptase und 1 µl Oligo dT Primer gemischt. Die RNA wurde zum Ansatz gegeben und der Ansatz bei 42°C für 60 min inkubiert. Zur Inaktivierung der Transkriptase folgte ein 5-minütiger Inkubationsschritt bei 95°C, anschließend wurde der Ansatz für mindestens 5 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde mit DEPC Wasser auf 100 µl verdünnt und in 10 µl Aliquots bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

6.2.6.2 PCR

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Für die PCR wurden jeweils 10 µl verdünnte cDNA aus der RT-PCR eingesetzt und zu 9,5 µl Mastermix, bestehend aus 5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 2 µl 10 µM Primer-Mix, pipettiert. Nach der Zugabe von 0,2 µl (1U) Taq DNA Polymerase und 30,3 µl DEPC Wasser wurde der Ansatz im Thermo Cycler nach dem in Abb. 26 angegebenen Schema inkubiert.

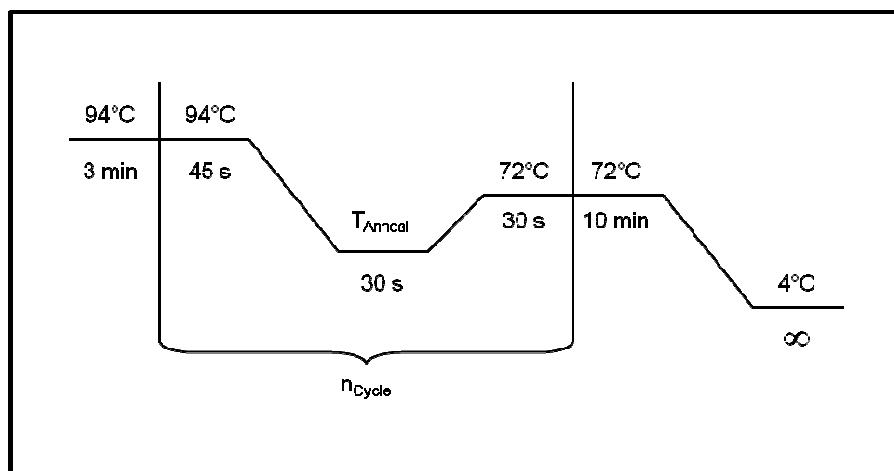


Abb. 26: Zyklusablauf der Polymerase Kettenreaktion

Als Positivkontrollen dienten HepG2-Zellen bzw. RNA aus einem cholangiozellulären Karzinom, als Negativkontrolle wurde Wasser anstelle der zu untersuchenden cDNA zugegeben. Die geeigneten PCR-Bedingungen wurden mit Hilfe der Positivkontrollen ermittelt (s. Tab. 8).

Tab. 8: Bedingungen für die Polymerase Kettenreaktion

Gen	Produktlänge	T_{Anneal}	n_{cycle}
β-Actin	327 bp	53°C	35
AFP	216 bp	55°C	35
Albumin	174 bp	55°C	35
Chromogranin A	254 bp	50°C	40
CK7	218 bp	55°C	35
CK14	237 bp	60°C	40
CK18	248 bp	53°C	30
CK19	318 bp	53°C	30
Nestin	295 bp	50 °C	40

6.2.7 Gelelektrophorese

Zur Analyse der erhaltenen PCR-Produkte wurden Gele verwendet, die 1,2% Agarose und 4 µg/ml Ethidiumbromid in 1× TBE-Puffer enthielten. Für die Elektrophorese wurde die DNA mit 6× Gelauftragspuffer gemischt. Die DNA-Fragmente im Gel wurden anschließend auf einem UV-Leuchtschirm ($\lambda=312$ nm) sichtbar gemacht und dokumentiert.

6.2.8 Zellkultur

Die Zellkultur der nach der MACS-Reinigung erhaltenen CD90+ Fraktion erfolgte sowohl in unbeschichteten als auch in Kollagen-beschichteten 24 well Zellkulturplatten. Pro Donor wurden nach Möglichkeit mindestens drei wells unter gleichen Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden im Adhärenzmedium mit einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/cm² ausgesät und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in wasserdampfgesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach einer Adhäsionszeit von 3-5 Tagen wurde das Medium abgenommen und die Zellen zum Entfernen von nicht-adhärierten Zellen einmal mit Aussaatmedium gewaschen. Nach der Zugabe des Kulturmediums wurden die Zellen wiederum im Brutschrank inkubiert. Weitere Mediumwechsel erfolgten wöchentlich. Wachstum und Morphologie der Zellen wurden täglich mikroskopisch begutachtet. Nach einer Kulturdauer von bis zu 28 Tagen wurden die Zellen entweder für immunhistochemische Färbungen in den Kulturschalen fixiert (s. 6.2.1.1.3) oder für die RNA-Isolation abgelöst (s. 6.2.5.1).

Publikationen

Teilergebnisse aus der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt veröffentlicht:

Publikation/Originalarbeit:

Weiss TS, Lichtenauer M, Kirchner S, Stock P, Aurich H, Christ B, Brockhoff G, Kunz-Schughart LA, Jauch K-W, Schlitt H-J, Thasler WE. Hepatic progenitor cells from adult human livers for cell transplantation. *GUT* **2008**, 57, 1129-1138.

Posterpräsentationen:

Thasler WE, Lichtenauer M, Weiss TS. Untersuchungen zum Proliferations- und Differentierungspotential hepatischer Vorläufer-Stammzellen: Erste Ergebnisse. *5. Forschungsklausur Klinik und Poliklinik für Chirurgie, 13.12.2002*, Regensburg.

Lichtenauer M, Gräbe A, Jahn B, Ouart J, Bhatia SN, Jauch KW, Anthuber M, Thasler WE, Weiss TS. Vorläuferzellen der adulten humanen Leber: Anreicherung potentieller hepatischer Vorläuferzellen und Etablierung eines in vitro Modells zur Untersuchung von Transdifferenzierungsprozessen. *Zwischenbegutachtung des ReForM-C: Isolierung, Differenzierung und Transdifferenzierung humaner Stammzellen, 21.02.2003*, Regensburg.

Lichtenauer M, Thasler WE, Gräbe A, Jahn B, Jauch KW, Schlitt HJ, Weiss TS. Isolation of non parenchymal liver cell fractions from surgical resected human liver tissue expressing hematopoietic and hepatic progenitor cell marker. *8. Chirurgische Forschungstage 2004, 27-30 October 2004, Mannheim. Langenbecks Arch Surg 2004*, 389, 441, 68.

Lichtenauer M, Thasler WE, Gräbe A, Jahn B, Jauch KW, Schlitt HJ, Weiss TS. Characterisation of non parenchymal cell fractions with hepatic progenitor cells from surgical resected human liver tissue. *Herbsttagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie (GBM), 19.-22.09.2004*, Münster.

Lichtenauer M, Thasler WE, Gräbe A, Jahn B, Jauch KW, Schlitt HJ, Weiss TS. Resected human liver tissue as a source for liver progenitor cells: Isolation and characterization of Thy-1 positive cells from non parenchymal liver cell fractions. 18th *Meeting of the German Association for the Study of the Liver (GASL)*, **28.-29.01.2005**, Ulm.

Vorträge:

Thasler WE, Lichtenauer M, Gräbe A , Jauch KW, Schlitt HJ , Weiss TS. Isolation und Charakterisierung von adulten, ortständigen Vorläuferzellen aus humanem Lebergewebe. *Bayerischer Chirurgenkongress*, **22.07.2005**, Bamberg.

Lichtenauer M, Thasler WE, Gräbe A, Jauch KW, Schlitt HJ, Weiss TS. Resected human liver tissue as a source for liver progenitor cells: Isolation and characterization of Thy-1 positive cells from nonparenchymal liver cell fractions. *4th Annual Meeting of the European Tissue Engineering Society (ETES)*, **03.09.2005**, München.

Literaturverzeichnis

- ¹ Kuntz E, Kuntz HD: *Praktische Hepatologie*. Johann Ambrosius Barth Verlag Heidelberg **1998**, 24.
- ² Löffler G, Petrides PE. *Biochemie und Pathobiochemie*. **19**, 1022-1039.
- ³ <http://www.organspende-und-transplantation.de/xenotransplantation.htm>
- ⁴ Organspende und Transplantation in Deutschland. Jahresbericht 2007 der Deutschen Stiftung Organtransplantation DSO, 39-42. http://www.dso.de/pdf/dso_jb2007_d.pdf
- ⁵ Giacomoni A, Lauterio A, Donadon M, De Gasperi A, Belli L, Slim A, Dorobantu B, Mangoni I, De Carlis L. Should we still offer split-liver transplantation for two adult recipients? A retrospective study of our experience. *Liver Transpl* **2008**, 14(7), 999-1006.
- ⁶ Starzl TE, Demetris AJ. History of renal transplantation. In: Shapiro R, Simmons RL, Starzl TE. *Renal Transplantation*. Appleton and Lange. Stamford/Connecticut **1997**, 25-424.
- ⁷ <http://www.organspende-und-transplantation.de/xenotransplantation.htm>
- ⁸ Bumgardner GL, Fasola C, Sutherland DE. Prospects for hepatocyte transplantation. *Hepatology* **1988**, 8(5), 1158-61.
- ⁹ Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, Mauer SM, Sowe A, Simmons RL, Najarian JS. Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasma bilirubin in Gunn rats. *Science* **1976** 192(4242), 892-894.
- ¹⁰ Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc* **1992** 24(6), 3052-3.
- ¹¹ Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PJ, Wilson JM. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat Genet* **1994**, 6(4), 335-341.
- ¹² Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet* **1996**, 12, 266-273.

- ¹³ 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, 1273-1280.
- ¹⁴ Pilichos C, Perrea D, Demonakou M, Preza A, Donta I. Management of carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats by syngeneic hepatocyte transplantation in spleen and peritoneal cavity. *World J Gastroenterol* **2004** 10(14), 2099–2102.
- ¹⁵ Nakamura J, Okamoto T, Schumacher IK, Tabei I, Chowdhury NR, ChowdhuryJR, Fox. Treatment of surgically induced acute liver failure by transplantation of conditionally immortalized hepatocytes. *Transplantation* **1997**, 63(11), 1541–1547.
- ¹⁶ Demetriou AA, Levenson SM, Novikoff PM, Novikoff AB, Chowdhury NR, Whiting J, Reisner A, Chowdhury JR. Survival, organization, and function of microcarrier-attached hepatocytes transplanted in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* **1986**, 83(19), 7475–7479.
- ¹⁷ Nagata H, Ito M, Cai J, Edge AS, Platt JL, Fox œIJ. Treatment of cirrhosis and liver failure in rats by hepatocyte xenotransplantation. *Gastroenterology* **2003**, 124(2), 422–431.
- ¹⁸ Fink G. *Die schönsten Sagen der Antike*. Artemis und Winkler Düsseldorf/Zürich **1999**, 21-23.
- ¹⁹ Higgins GM, Anderson RM. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathol* **1931**, 12, 186-202.
- ²⁰ Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* **1997**, 276, 60-66.
- ²¹ Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* **2000**, 32(suppl.1), 19-31.
- ²² Francavilla A, Polimeno L, Barone M, Azzarone A, Starzl TE. Hepatic regeneration and growth factors. *J Surg Onc* **1993**, Suppl.3, 1-7.
- ²³ Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **1989**, 86, 1558-1562.
- ²⁴ Gómez-Lechón MJ, Castelli J, Guillén I, O'Connor E, Nakamura T, Fabra R, Trullenque R. Effects of Hepatocyte Growth Factor on the Growth and Metabolism of Human Hepatocytes in Primary Culture. *Hepatology* **1995**, 21, 1248-1254.

- ²⁵ Runge DM, Runge D, Dorko K, Pisarov LA, Leckel K, Kostrubsky VE, Thomas D, Strom SC, Michalopoulos GK. Epidermal growth factor- and hepatocyte growth factor-receptor activity in serum-free cultures of human hepatocytes. *J Hepatology* **1999**, 30, 265-274.
- ²⁶ Francavilla A, Starzl TE, Porter K, Foglieni CS, Michalopoulos GK, Carrieri G, Trejo J, Azzarone A, Barone, M, Zeng QH. Screening for candidate hepatic growth factors by selective portal infusion after Canine Eck's fistula. *Hepatology* **1991**, 14(4 Pt 1). 665-670.
- ²⁷ Francavilla A, Hagiya M, Porter KA, Polimeno L, Ihara I, Starzl TE. Augmenter of liver regeneration: Its place in the universe of hepatic growth factors. *Hepatology* **1994**, 20 (3), 747-757.
- ²⁸ Francavilla A, Starzl TE, Barone M, Zeng Q-H, Porter KA, Zeevi A, Markus PM, van den Brink MRM, Todo S. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporin and FK506. *Hepatology* **1991**, 14, 140-143.
- ²⁹ Francavilla A, Azzarone A, Carrieri G, Scotti-Foglieni C, Zeng QH, Cillo V, Porter K, Starzl TE. The effect on the canine Eck fistula liver of intraportal TGF-beta alone or with hepatic growth factors. *Hepatology* **1992**, 16, 1267-1270.
- ³⁰ Nakamura T, Araraki R, Ichihara A. Interleukin-1 is a potent growth inhibitor of adult rat hepatocytes in primary culture. *Exp Cell Res* **1988**, 179, 488-497.
- ³¹ Francavilla A, Starzl TE, Scotti C, Carrieri G, Azzarone S, Zeng QH, Porter KA, Schreiber SL. Inhibition of liver, kidney and intestine regeneration by rapamycin. *Transplantation* **1992**, 53, 496-498.
- ³² Stocker E, Wullstein HK, Brau G. Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine. *Virchows Arch B Cell Pathol* **1973**, 14(2), 93-103.
- ³³ Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: A model of hepatic regeneration. *Hepatology* **1994**, 19, 210-216.
- ³⁴ Starzl TE, Fung J, Tzakis A, Todo S, Demetris AJ, Marino IR, Doyle H, Zeevi A, Warty V, Michaels M, Rudert WA, Trucco M. Baboon-to-human liver transplantation. *Lancet* **1993**, 341, 65-71.
- ³⁵ Kam I, Lynch S, Svanas G, Todd S, Polimeno L, Francavilla A, Penkrot RJ, Takaya S, Ericzon BG, Starzl TE, Van Thiel DH.: Evidence that host size determines liver size: Studies in dogs receiving orthotopic liver transplants. *Hepatology* **1987**, 7(2), 362-366.

- ³⁶ Kawasaki S, Makuuchi M, Ishizone S, Matsunami H, Terada M, Kawarazaki H. Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Lancet* **1992**, 339, 580-581.
- ³⁷ Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* **1997**, 276, 60-66.
- ³⁸ Petersen BE, Zajac VF, Michalopoulos GK. Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* **1998**, 27, 1030-1038.
- ³⁹ Sell S, Leffert HL, Shinozuka H, Lombardi B, Gochman N. Rapid development of large numbers of alpha-fetoprotein-containing "oval" cells in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetamide in a choline-devoid diet. *Gann* **1981**, 72, 479-487.
- ⁴⁰ Yavorkovsky L, Lai E, Ilic Z, Sell S. Participation of small intra portal stem cells in the restorative response to periportal injury induced in rats by allyl alcohol. *Hepatology* **1995**, 21, 1702-1712.
- ⁴¹ Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS. Origin and fate of oval cells in dipin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* **1994**, 145, 409-422.
- ⁴² Laurson J, Selden C, Hodgson HJF. Hepatocyte progenitors in man and in rodents – multiple pathways, multiple candidates. *Int J Exp Pathol* **2005**, 86, 1-18.
- ⁴³ Evarts RP, Nagy P, Nakatsuka H, Marsden E, Thorgeirsson SS. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res* **1989**, 49, 1541-1547.
- ⁴⁴ Tee LB, Kirilak Y, Huang WH, Morgan RH, Yeoh GC. Differentiation of oval cells into duct-like cells in preneoplastic liver of rats placed on a choline-deficient diet supplemented with ethionine. *Carcinogenesis* **1994**, 15, 2747-2756.
- ⁴⁵ Fausto N, Lemire JM, Shiojiri N. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **1993**, 204, 237-241.
- ⁴⁶ Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* **1999**, 154, 537-541.
- ⁴⁷ Van Eyken P, De Vos R, Desmet V. Progenitor ("stem") cells in alcoholic liver disease?. In: de la Hall P (editor). *Alcoholic liver disease. Pathology and Pathogenesis*. Edward Arnold London **1995**, 160-171.

- ⁴⁸ Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, De Vos R, Huang X, Achter 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, 1301-1311.
- ⁴⁹ Sun C, Jin XL, Xiao JC. Oval cells in hepatitis B virus-positive and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis: histological and ultrastructural study. *Histopathology* **2006**, 48(5), 546-555.
- ⁵⁰ Crosby HA, Hubscher S, Fabris L, Joplin R, Sell S, Kelly D, Strain AJ. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* **1998**, 152, 771-779.
- ⁵¹ Seki S, Kitada T, Sakaguchi H, Iwai S, Kawada N, Hayashi Y, Kim SR. Expression of progenitor cell markers in livers with fulminant massive necrosis. *Hepatol Res* **2003**, 25, 149-157.
- ⁵² Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and structural evolution of the early proliferating oval cell in rat liver. *Am J Pathol* **2001**, 158, 1313-1323.
- ⁵³ 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, 1425-1433.
- ⁵⁴ Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw ASH, Hytiroglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitch JH, Nakanuma Y, Olynk JK, Park YN, Protmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules and ductular reactions in human livers. *Hepatology* **2004**, 39, 1739-1745.
- ⁵⁵ Fausto N. Liver regeneration and repair: Hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology* **2004**, 39(6), 1477-1487.
- ⁵⁶ De Vos R, Desmet V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* **1992**, 140(6), 1441-1450.
- ⁵⁷ Roskams T, De Vos R, Desmet V. „Undifferentiated progenitor cells“ in focal nodular hyperplasia of the liver. *Histopathology* **1996**, 28, 291-299.

- ⁵⁸ Xiao JC, Ruck P, Kaiserling E. Small epithelial cells in extrahepatic biliary atresia: electron microscopic and immunoelectron microscopic findings suggest a close relationship to liver progenitor cells. *Histopathology* **1999**, 35, 454-460.
- ⁵⁹ Germain L, Goyette R, Marceau N. Differential cytokeratin and alpha-fetoprotein expression in morphologically distinct epithelial cells emerging at the early stage of rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* **1985**, 45, 673-681.
- ⁶⁰ Hixson DC, Allison JP. Monoclonal antibodies recognizing oval cells induced in the liver of rats by N-2-fluorenylacetamide or ethionine in a choline-deficient diet. *Cancer Res* **1985**, 45, 3750-3760.
- ⁶¹ He ZP, Tan WQ, Tang YF, Zhang HJ, Feng MF. Activation, isolation, identification and in vitro proliferation of oval cells from adult rat livers. *Cell Prolif* **2004**, 37, 177-187.
- ⁶² Wang J, Clark JB, Rhee G-S, Fair JH, Reid LM. Proliferation and hepatic differentiation of adult-derived progenitor cells. *Cells Tissues Organs* **2003**, 173, 193-203.
- ⁶³ Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Res* **1990**, 50, 3811-3815.
- ⁶⁴ Alison M, Sarraf C. Hepatic stem cells. *J Hepatol* **1998**, 29, 676-682.
- ⁶⁵ Desmet V, Roskams T, Van Eyken P. Ductular reaction in the liver. *Pathol Res Pract* **1995**, 191, 513-524.
- ⁶⁶ Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlström H, Lendahl U, Frisen J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* **2000**, 288, 1660-1663.
- ⁶⁷ 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, 142-147.
- ⁶⁸ Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* **1998**, 27, 433-445.
- ⁶⁹ Baumann U, Crosby HA, Ramani P, Kelly DA, Strain AJ. Expression of the stem cell factor receptor c-kit in normal and diseased pediatric liver: identification of a human hepatic progenitor cell? *Hepatology* **1999**, 30, 112-117.

- ⁷⁰ 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. *Nature Medicine* **2000**, 6(11), 1229-1234.
- ⁷¹ Avital I, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferraro C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou AA. Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells. *Biochem Biophys Res Comm* **2001**, 288, 156-164.
- ⁷² Alison MR, Poulsom 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.
- ⁷³ Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei P, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* **2000**, 32, 11-16.
- ⁷⁴ Oh S-H, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Comm* **2000**, 279, 500-504.
- ⁷⁵ Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, Huh N. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Comm* **2002**, 298, 24-30.
- ⁷⁶ Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu W-S, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* **2002**, 109(10), 1291-1302.
- ⁷⁷ Fiegel HC, Lioznov MV, Cortes-Dericks L, Lange C, Kluth D, Fehse B, Zander AR. Liver-Specific gene expression in cultured human hematopoietic stem cells. *Stem Cells* **2003**, 21, 98-104.
- ⁷⁸ Theise ND. Blood to liver and back again: seeds of understanding. *J Hematol* **2003**, 88(4), 361-362.
- ⁷⁹ Alpini G, Lenzi R, Sarkozy L, Tavoloni N. Biliary physiology in rats with bile ductular cell hyperplasia. Evidence for a secretory function of proliferated bile ductules. *J Clin Invest* **1988**, 81, 569-578.
- ⁸⁰ Shroyer KR, Nakane PK. Immunohistochemical localization of albumin and in situ hybridization of albumin RNA. *Cell Biochem Funct* **1987**, 5, 195-210.

- ⁸¹ Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* **1993**, 143, 1050-1054.
- ⁸² Wu PC, Fang JWS, Lau VKT, Lai CL, Lo CK, Lau JYN. Classification of hepatocellular carcinoma according to hepatocellular and biliary differentiation markers. *Am J Pathol* **1996**, 149, 1167-1175.
- ⁸³ Fiegel HC, Park JJH, Lioznov MV, Martin A, Jaeschke-Melli S, Kaufmann PM, Fehse B, Zander AR, Kluth D. Characterization of cell types during rat liver development. *Hepatology* **2003**, 37, 148-154.
- ⁸⁴ Van Eyken P, Desmet VJ. Cytokeratins and the liver. *Liver* **1993**, 13, 113-122.
- ⁸⁵ Bartek J, Bartkova J, Taylor-Papadimitriou J, Rejthar A, Kovarik J, Lukas Z, Vojtesek B. Differential expression of keratin 19 in normal human epithelial tissue revealed by monospecific monoclonal antibodies. *Histochem J* **1986**, 18, 565-575.
- ⁸⁶ Alison MR, Golding M, Sarraf CE, Edwards RJ, Lalani E-N. Liver damage in the rat induces hepatocyte stem cells from biliary epithelial cells. *Gastroenterology* **1996**, 110, 1182-1190.
- ⁸⁷ Momburg F, Moldenhauer G, Hammerling GH, Moller P. Immunohistochemical study of the surface expression of a Mr 34.000 human epithelium-specific glycoprotein in normal and malignant tissue. *Cancer Res* **1987**, 47, 2883-2891.
- ⁸⁸ de Boer CJ, van Krieken JHJM, Janssen-van Rhijn C, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic and neoplastic liver. *J Pathol* **1999**, 188, 201-206.
- ⁸⁹ Koenig S, Krause P, Drabent B, Schaeffner I, Christ B, Schwartz P, Unthan-Fechner K, Probst I. The expression of mesenchymal, neural and haematopoietic stem cell markers in adult hepatocytes proliferating in vitro. *J Hepatol* **2006**, 44(6), 1115-1124.
- ⁹⁰ Libbrecht L, Desmet V, Van Damme B, Roskams T. The immunohistochemical phenotype of dysplastic foci in human liver: correlation with putative progenitor cells. *J Hepatol* **2000**, 33, 76-84.
- ⁹¹ Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY. JC70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* **1990**, 43, 752-757.

- 92 Ohnishi T, Arnold LL, Clark NM, Wisecarver JL, Cohen SM. Comparison of endothelial cell proliferation in normal liver and adipose tissue in B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicol Pathol* **2007**, 35(7), 904-909.
- 93 Tomita M, Yamamoto K, Kobashi H, Ohmoto M, Tsuji T. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. *Hepatology* **1994**, 20, 317-325.
- 94 Pulford KAF, Sipos A, Cordell JL, Stross WP, Mason DY. Distribution of the CD68 macrophage/myeloid associated antigen. *Int Immunol* **1990**, 2(10), 973-980.
- 95 Kelly PMA, Bliss E, Morton JA, Burns J, McGee JO'D. Monoclonal antibody EBM/11: high cellular specificity for human macrophages. *J Clin Pathol* **1988**, 41, 510-515.
- 96 Rippe RA, Almounajed G, Brenner DA. Sp1 Binding activity increases in activated ito cells. *Hepatology* **1995**, 22, 241-251.
- 97 Nouchi T. Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* **1991**, 11, 193-203.
- 98 Stiling H, Mühlbauer M, Bataille F, Schölmerich J, Werner S, Hellerbrand C. Activated hepatic stellate cells express keratinocyte growth factor in chronic liver disease. *Am J Pathol* **2004**, 165(4), 1233-1241.
- 99 Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the C34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 1-13.
- 100 Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* **2003**, 37, 632-640.
- 101 Henniker AJ. CD90. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 392-393.
- 102 Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, Michalopoulos GK. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. *Hepatology* **1998**, 27, 433-445.
- 103 Canonico B, Felici C, Papa S. CD117. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 90-94.
- 104 Omori M, Omori N, Evarts RP, Teramoto T, Thorgeirsson SS. Coexpression of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/c-kit signal transduciton system in bile-duct-ligated SI and W mice. *Am J Pathol* **1997**, 150, 1179-1187.

- ¹⁰⁵ Van Den Heuvel MC, Sloof MJH, Visser L, Muller M, DeJong KP, Poppema S, Gouw ASH. Expression of anti-OV6 antibody and anti-N-CAM antibody along the biliary line of normal and diseased human livers. *Hepatology* **2001**, 33, 1387-1393.
- ¹⁰⁶ Paku S, Nagy P, Kopper L, Thorgeirsson SS. 2-Acetylaminofluorene dose-dependent differentiation of rat oval cells into hepatocytes: confocal and electron microscopic studies. *Hepatology* **2004**, 39, 1353-1361.
- ¹⁰⁷ Haque S, Haruna Y, Saito, K, Nalesnik MA, Atillasoy E, Thung SN, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab Invest* **1996**, 75, 699-705.
- ¹⁰⁸ Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* **1996**, 23, 476-481.
- ¹⁰⁹ Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* **1999**, 154, 537-541.
- ¹¹⁰ Steinberg P, Weisse G, Eigenbrodt E, Oesch F. Expression of L- and M2-pyruvate kinases in proliferating oval cells and cholangiocellular lesions developing in the livers of rats fed a methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* **1994**, 15, 125-127.
- ¹¹¹ Strain AJ, Crosby HA, Nijjar S, Kelly DA, Hubscher SG. Human liver-derived stem cells. *Sem Liv Dis* **2003**, 23(4), 373-383.
- ¹¹² Pereira C, Clarke E, Damen J. Hematopoietic colony-forming cell assays. *Methods Mol Biol* **2007**, 407, 177-208.
- ¹¹³ Kmiec Z. *Cooperation of liver cells in health and disease*. Springer Verlag **2001**, 9-12.
- ¹¹⁴ Alpini G, Roberts S, Kuntz SM, Ueno Y, Gubba S, Podila PV, LeSage G, LaRusso N. Morphological, molecular and functional heterogeneity of cholangiocytes from normal rat liver. *Gastroenterology* **1996**, 110, 1636-1643.
- ¹¹⁵ Reinke P, David H. Struktur und Funktion der Sinusoidwand der Leber. („Die perisinusoidale Funktionseinheit“). Eine Übersicht. *Z Mikrosk Anat Forsch* **1987**, 101(1), 91-136.
- ¹¹⁶ Wake K, Decker K, Kirn A. Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* **1989**, 118, 173-192.

- ¹¹⁷ Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* **1996**, 24, 719-730.
- ¹¹⁸ analog: Alpini G, Phillips JO, Vroman B, LaRusso NF. Recent advances in the isolation of liver cells. *Hepatology* **1994**, 20(2), 494-514.
- ¹¹⁹ Kuntz E, Kuntz HD: *Praktische Hepatologie*. Johann Ambrosius Barth Verlag Heidelberg **1998**, 12-22.
- ¹²⁰ Shroyer KR, Nakane PK. Immunohistochemical localization of albumin and in situ hybridization of albumin RNA. *Cell Biochem Funct* **1987**, 5, 195-210.
- ¹²¹ Wennerberg AE, Nalesnik MA, Coleman WB. Hepatocyte paraffin 1: a monoclonal antibody that reacts with hepatocytes and can be used for differential diagnosis of hepatic tumors. *Am J Pathol* **1993**, 143, 1050-1054.
- ¹²² Van Eyken P, Desmet VJ. Cytokeratins and the liver. *Liver* **1993**, 13, 113-122.
- ¹²³ de Boer CJ, van Krieken JHJM, Janssen-van Rhijn C, Litvinov SV. Expression of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic and neoplastic liver. *J Pathol* **1999**, 188, 201-206.
- ¹²⁴ Ohnishi T, Arnold LL, Clark NM, Wisecarver JL, Cohen SM. Comparison of endothelial cell proliferation in normal liver and adipose tissue in B6C3F1 mice, F344 rats, and humans. *Toxicol Pathol* **2007**, 35(7), 904-909.
- ¹²⁵ Pulford KAF, Rigney EM, Micklem KJ, Jones M, Stross WP, Gatter KC, Mason DY. KP1: A new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* **1989**, 42, 414-421.
- ¹²⁶ Tomita M, Yamamoto K, Kobashi H, Ohmoto M, Tsuji T. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. *Hepatology* **1994**, 20, 317-325.
- ¹²⁷ Neubauer K, Knittel T, Aurisch S, Fellmer P, Ramadori G. Glial fibrillary acidic protein - a cell type specific marker for Ito cells in vivo and in vitro. *J Hepatol* **1996**, 24, 719-730.
- ¹²⁸ Nouchi T. Appearance of alpha-smooth-muscle-actin-positive cells in hepatic fibrosis. *Liver* **1991**, 11, 193-203.
- ¹²⁹ Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* **1996**, 87, 1-13.

- ¹³⁰ Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the C34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 1-13.
- ¹³¹ Zucchini A, Del Zotto G, Brando B, Canonico B. CD90. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 82-85.
- ¹³² Henniker AJ. CD90. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 392-393.
- ¹³³ Canonico B, Felici C, Papa S. CD117. *J Biol Regul Homeost Agents* **2001**, 15, 90-94.
- ¹³⁴ Hassan HT, Zander A. Stem cell factor as a survival and growth factor in normal and malignant hematopoiesis. *Acta Haematol* **1996**, 95, 257-262.
- ¹³⁵ Dunsford HA, Sell S. Production of monoclonal antibodies to preneoplastic liver cell populations induced by chemical carcinogens in rat and to transplantable Morris hepatomas. *Cancer Res* **1989**, 49, 4887-4893.
- ¹³⁶ Dunsford HA, Karnasuta C, Hunt CM, Sell S. Monoclonal antibodies identify different lineages of chemically induced hepatocellular carcinomas in rats. *Cancer Res* **1989**, 49, 4894-4900.
- ¹³⁷ Blakolmer K, Jaskiewicz K, Dunsford HA, Robson SC. Hemopoietic stem cell markers are expressed by ductal plate and bile duct cells in developing human liver. *Hepatology* **1995**, 21, 1510-1516.
- ¹³⁸ Crosby HA, Hubscher SG, Joplin RE, Kelly DA, Strain AJ. Immunolocalization of OV-6, a putative progenitor cell marker in human fetal and diseased pediatric liver. *Hepatology* **1998**, 28, 980-985.
- ¹³⁹ Roskams T, De Vos R, Van Eyken P, Myazaki H, Van Damme B, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *J Hepatol* **1998**, 29, 455-463.
- ¹⁴⁰ Bisgaard HC, Parmelee DC, Dunsford HA, Sechi S, Thorgeirsson SS. Keratin 14 protein in cultured nonparenchymal rat hepatic epithelial cells: characterization of keratin 14 and keratin 19 as antigens for the commonly used mouse monoclonal antibody OV-6. *Mol Carcinog* **1993**, 7, 60-66.
- ¹⁴¹ Crosby HA, Hubscher S, Fabris L, Joplin R, Sell S, Kelly D, Strain AJ. Immunolocalization of putative liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *Am J Pathol* **1998**, 152, 771-779.

- ¹⁴² Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* **1982**, 31(1), 11-24.
- ¹⁴³ Blouin R, Blouin MJ, Royal I, Grenier A, Roop DR, Loranger A, Marceau N. Cytokeratin 14 expression in rat liver cells in culture and localization in vivo. *Differentiation* **1992**, 52(1), 45-54.
- ¹⁴⁴ Marceau N. Cell lineages and differentiation programs in epidermal, urothelial and hepatic tissues and their neoplasms. *Lab Invest* **1990**, 63, 4-20.
- ¹⁴⁵ Haque S, Haruna Y, Saito K, Nalesnik MA, Atillasoy E, Thung SN, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver regeneration. *Lab Invest* **1996**, 75(5), 699-705.
- ¹⁴⁶ Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology* **1996**, 23, 476-481.
- ¹⁴⁷ Tian Y-W, Smith PGJ, Yeoh GCT. The oval-shaped cell as a candidate for a liver stem cell in embryonic, neonatal and precancerous liver: identification based on morphology and immunohistochemical staining for albumin and pyruvate kinase isoenzyme expression. *Histochem Cell Biol* **1997**, 107, 243-250.
- ¹⁴⁸ Steinberg P, Weisse G, Eigenbrodt E, Oesch F. Expression of L- and M2-pyruvate kinases in proliferating oval cells and cholangiocellular lesions developing in the livers of rats fed a methyl-deficient diet. *Carcinogenesis* **1994**, 15, 125-127.
- ¹⁴⁹ Parent R, Marion M-J, Furio L, Trépo C, Petit M-A. Origin and characterization of a human bipotent liver progenitor cell line. *Gastroenterology* **2004**, 126, 1147-1156.
- ¹⁵⁰ Lowes KN, Brennan BA, Yeoh GC, Olynyk JK. Oval cell numbers in human chronic liver diseases are directly related to disease severity. *Am J Pathol* **1999**, 154, 537-541.
- ¹⁵¹ Smith PGJ, Tee LBG, Yeoh GCT. Appearance of oval cells in the liver of rats after long-term exposure to ethanol. *Hepatology* **1996**, 23, 145-154.
- ¹⁵² Alison M, Sarraf C. Hepatic stem cells. *J Hepatol* **1998**, 29, 676-682.
- ¹⁵³ Fausto N, Lemire JM, Shiojiri N. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **1993**, 204, 237-241.

- 154 Fausto N, Lemire JM, Shiojiri N. Cell lineages in hepatic development and the identification of progenitor cells in normal and injured liver. *Proc Soc Exp Biol Med* **1993**, 204, 237-241.
- 155 Fabris L, Strazzabosco M, Crosby HA, Ballardini G., Hubscher SG, Kelly DA, Neuberger JM, Strain AJ, Joplin R. Characterization and isolation of ductular cells coexpressing neural cell adhesion molecule and Bcl-2 from primary cholangiopathies and ductal plate malformations. *Am J Pathol* **2000**, 156(5), 1599-1612.
- 156 Alpini G, Lenzi R, Zhai W-R, Liu MH, Slott PA, Paronetto F, Tavoloni N. Isolation of a nonparenchymal liver cell fraction enriched in cells with biliary epithelial phenotypes. *Gastroenterology* **1989**, 97, 1248-1260.
- 157 Ishii M, Vroman B, LaRusso NF. Isolation and morphologic characterization of bile duct epithelial cells from normal rat liver. *Gastroenterology* **1989**, 97, 1236-1247.
- 158 Omori N, Omori M, Evarts RP, Teramoto T, Miller MJ, Hoang TN, Thorgeirsson SS. Partial cloning of rat CD34 cDNA and expression during stem cell-dependent liver regeneration in the adult rat. *Hepatology* **1997**, 26, 720-727.
- 159 Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest* **1994**, 70, 511-516.
- 160 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, 534-544.
- 161 Gerlach JC, Zeilinger K, Spatkowski G, Hentschel F, Schnoy N, Kolbeck S, Schindler RK, Neuhaus P. Large-scale isolation of sinusoidal endothelial cells from pig and human liver. *J Sug Res* **2001**, 100, 39-45.
- 162 Prickett TCR, McKenzie JL, Hart DNJ. Characterization of interstitial dendritic cells in human liver. *Transplantation* **1988**, 46(5), 754-761.
- 163 Taniguchi H, Suzuki A, Zheng Y, Kodo R, Takada Y, Fukunaga K, Seino K, Yuzawa K, Otsuka M. Usefulness of flow-cytometric cell sorting for enrichment of hepatic stem and progenitor cells in the liver. *Transplant Proc* **2000**, 32, 249-251.
- 164 Petersen BE, Grossbard B, Hatch H, Pi L, Deng J, Scott EW. Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology* **2003**, 37, 632-640.

- ¹⁶⁵ Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineages and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* **1991**, 51, 2611-2620.
- ¹⁶⁶ Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Sem Liv Dis* **2003**, 23(4), 385-396.
- ¹⁶⁷ Lemire JM, Shiwiri N, Fausto N. Oval cell proliferation and the origin of small hepatocytes in liver injury induced by D-galactosamine. *Am J Pathol* **1991**, 139, 535-552.
- ¹⁶⁸ Simon JP, Aunis D. Biochemistry of the chormogranin A protein family. *Biochem J* **1989**, 262, 1-13.
- ¹⁶⁹ Liu C, Schreiter T, Dirsch O, Gerken G, Oldhafer KJ, Broelsch CE, Treichel U. Presence of markers for liver progenitor cells in human-derived intrahepatic biliary epithelial cells. *Liver Int* **2004**, 24, 669-678.
- ¹⁷⁰ Rubin EM, Martin AA, Thung SN, Gerber MA. Morphometric and immunohistochemical characterization of human liver regeneration. *Am J Pathol* **1995**, 147(2), 397-404.
- ¹⁷¹ Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *The Anatomical Record Part A* **2004**, 280A, 910-923.
- ¹⁷² Sun XY, An J. Expression of nestin, an intermediate filament protein, in human fetal hepatic stem cells. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* **2004**, 24, 207-209.
- ¹⁷³ Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszzuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM. Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* **2004**, 61, 2510-2522.
- ¹⁷⁴ Thorgeirsson SS, Evarts RP, Bisgaard HC, Fujio K, Hu Z. Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. *Proc Soc Exp Biol Med* **1993**, 204, 253-260.
- ¹⁷⁵ Tan J, Hytioglou P, Wieczorek R, Park YN, Thung SN, Arias B, Theise ND. Immunohistochemical evidence for hepatic progenitor cells in liver diseases. *Liver* **2002**, 22, 265-373.
- ¹⁷⁶ Park YN, Brody RI, Sigal SH, Thung SN, Theise ND. OV-6 positive, HepPar1 negative oval-like cells in human livers with hepatitis C cirrhosis or with acetaminophen toxicity. *Hepatology* **1995**, 22, 230A.

- ¹⁷⁷ Joplin R, Hishida T, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Ayres R, Neuberger JM, Strain AJ. Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor. *J Clin Invest* 1992, 90, 1284-1289.
- ¹⁷⁸ Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu W-S, Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002, 109, 1291-1302.
- ¹⁷⁹ Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Sem Liv Dis* 2003, 23(4), 385-396.
- ¹⁸⁰ Thorgeirsson SS, Evarts RP, Bisgaard HC, Fujio K, Hu Z. Hepatic stem cell compartment: activation and lineage commitment. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993, 204, 253-260.
- ¹⁸¹ Roskams T, Cassiman D, De Vos R, Libbrecht L. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver. *The Anatomical Record Part A* 2004, 280A, 910-923.
- ¹⁸² www.ambulante-leberdialyse-muenchen.de
- ¹⁸³ Sauer M. Innovative Strategien zur Therapie des Leberversagens – artifizielle, bioartifizielle und biologische Leberunterstützungskonzepte. *Habilitationsschrift* 2008, CharitéCentrum für Chirurgische Medizin, Berlin.
- ¹⁸⁴ Weiss TS, Jahn B, Cetto M, Jauch KW, Thasler WE. Collagen sandwich culture affects intracellular polyamine levels of human hepatocytes. *Cell Prolif* 2002, 35(5), 257-267.
- ¹⁸⁵ <http://www.organspende-und-transplantation.de/xenotransplantation.htm>
- ¹⁸⁶ Costa FF, Le Blanc K, Brodin B. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells* 2007, 25(3), 707-711.
- ¹⁸⁷ Chung S, Shin BS, Hedlund E, Pruszak J, Ferree A, Kang UJ, Isacson O, Kim KS. Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation. *J Neurochem* 2006, 97(5), 1467-80.
- ¹⁸⁸ Donner S. Zusammenhang zwischen Krebsentstehung und adulten bzw. embryonalen Stammzellen. Wissenschaftliche Dienste des Deutschen Bundestages **07.04.2007**, Ausarbeitung WD 8 – 36/07.

- 189 GE Healthcare Handbook. Percoll, Methodology and Application. www6.gelifesciences.com/APTRIX/upp01077.nsf/Content/orderonline_handbooks. Product code 18-1115-69.
- 190 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, 534-544.
- 191 Joplin R, Hishida T, Tsubouchi H, Daikuhara Y, Ayres R, Neuberger JM, Strain AJ. Human intrahepatic biliary epithelial cells proliferate in vitro in response to human hepatocyte growth factor. *J Clin Invest* **1992**, 90, 1284-1289.
- 192 Lázaro CA, Croager EJ, Mitchell C, Campbell JS, Yu C, Foraker J, Rhim JA, Yeoh GCT, Fausto N. Establishment, characterization and long-term maintenance of cultures of human fetal hepatocytes. *Hepatology* **2003**, 38, 1095-1106.
- 193 <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tbid/452/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology>
- 194 Thasler WE, Weiss TS, Schillhorn K, Irrgang B, Jauch KW. Die Verwendung menschlichen Gewebes in der Forschung. *Dtsch.Med.Wochenschr* **2002**, 127 (25-26), 1397-1400.
- 195 Fabris L, Strazzabosco M, Crosby HA, Ballardini G., Hubscher SG, Kelly DA, Neuberger JM, Strain AJ, Joplin R. Characterization and isolation of ductular cells coexpressing neural cell adhesion molecule and Bcl-2 from primary cholangiopathies and ductal plate malformations. *Am J Pathol* **2000**, 156(5), 1599-1612.
- 196 Weiss TS, Pahernik S, Scheruebl I, Jauch KW, Thasler WE: Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol* **2003**, 38, 476-482.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn PD Dr. Thomas Weiss, der mir als Betreuer stets hilfreich zur Seite stand. Seine konstruktive Kritik und die zahlreichen Diskussionen halfen mir immer wieder, neue Lösungsansätze zu finden.

Herrn Prof. Dr. A. Göpferich danke ich herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens und die damit verbundene Mühe.

Bei Herrn PD Dr. Wolfgang Thasler möchte ich mich vor allem für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit und seine konstruktive Unterstützung beim Zusammenschreiben bedanken.

Meinen Kollegen vom ZLF Anja Gräbe, Rania Dayoub, Stefan Kirchner, Joachim Ouart, Sabine Laberer und Birgit Jahn danke ich für die tolle Zusammenarbeit und ihre Hilfe bei allen Problemen des Laboralltags.

Bei meinen Kollegen im H4, allen voran bei Dagmar Klein, Astrid Schwend und Christine Sattler, bedanke ich mich für die freundliche Aufnahme und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Bei Gunnar Müller für seine Unterstützung bei den ersten durchflusszytometrischen Messungen, die Hilfe bei den CFU-Assays und natürlich für die vielen netten Gespräche.

Für ihren Einsatz bei der Beseitigung von Rechtschreib- und Grammatikfehlern bedanke ich mich bei meiner Schwester Regina.

Bei Frank Winter für die Hilfe bei der Datenrekonstruktion nach den beiden Festplattencrashs.

Bei Gerald für seine geduldige Unterstützung bei allen auftretenden Problemen und seine ständige Ermutigung während der langen Zeit des Zusammenschreibens.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, vor allem meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und das Auf und Ab von Studium und Promotion geduldig mit mir ertragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 03.02.2010

(Ort, Datum)

.....

(Monika Lichtenauer)