

Aus der Abteilung Allgemeinchirurgie
(Prof. Dr. med. H. Becker)
im Zentrum Chirurgie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Integration und Repopulation nach hepatozellulärer
Transplantation im Rattenmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Claudia Ilse Stößer
aus
Erfurt

Göttingen 2005

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. Becker

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. I. Probst

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Leberzelltransplantation als Perspektive für die humane Applikation	1
1.2	Experimentelle Tiermodelle	3
1.2.1	Nachweismethoden transplanteder Hepatozyten	3
1.2.2	Dipeptidylpeptidase IV-Fischer-344-Ratten-Transplantationsmodell	4
1.2.3	Selektive Leberrepopulation nach Hepatozyten-transplantation	5
1.3	Integrationsmechanismen transplanteder Zellen	6
1.3.1	Kinetik der Integration und Repopulation	7
1.3.2	Rolle von Zelladhäsionsmolekülen	7
1.4	Fragestellung	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Herstellernachweis der Reagenzien	11
2.2	Verbrauchsmaterialien für die Zellpräparation und Zelltransplantation	12
2.3	Gerätenachweis	13
2.4	Herstellernachweis der Antikörper	13
2.4.1	Primärantikörper	13
2.4.2	Sekundärantikörper	14
2.5	Verwendete Tiere	14
2.5.1	Spendertiere	14
2.5.2	Empfängertiere	14
2.6	Schädigung der Rattenleber mit Retrorsin	15

2.7	Präparation von Hepatozyten aus Rattenleber	16
2.7.1	Allgemeines	16
2.7.2	Herstellung der Perfusionslösung	16
2.7.3	Gewinnung von isolierten Hepatozyten	18
2.7.4	Reinigung der Zellsuspension	20
2.7.5	Erstellen von Zytospins	20
2.8	Transplantation von Hepatozyten in die Pfortader	21
2.8.1	Leberteilresektion	21
2.8.2	Intraportale Transplantation von Hepatozyten	21
2.9	Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben	21
2.9.1	Organentnahme	21
2.9.2	Fixierung der Gewebeproben	22
2.9.3	Kryoschnitte	22
2.10	Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten	22
2.10.1	Hintergrundreaktivität	23
2.10.2	Färbeprotokolle	23
2.11	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	26
2.12	Histochemische Detektion der transplantierten Zellen an Kryoschnitten	26
2.13	Fotodokumentation	27
2.14	Analyse im Durchflusszytometer (FACS)	27
2.14.1	Aufarbeitung der Zellsuspension für die FACS-Analyse	27

3 Ergebnisse

3.1	Charakterisierung der präparierten Spenderhepatozyten vor Transplantation mittels Zytospin	29
3.2	Integration und Repopulation von Spenderzellen in der Empfängerleber	29
3.2.1	Nachweis von Spenderhepatozyten zum frühen Zeitpunkt nach Transplantation im Empfängerparenchym	30

3.2.2	Kinetik der Repopulation	32
3.2.3	Quantitative Analyse der Repopulation	34
3.2.4	Übertritt transplantierter Hepatozyten durch die Endothelzellbarriere	36
3.3	Analyse der interzellulären Kommunikation (Adhäsion) während des Integrations- und Repopulations- prozesses	38
3.3.1	Analyse der Rolle von ICAM-1	38
3.3.2	Analyse der Rolle von E-Cadherin	40
3.3.3	Darstellung des leberspezifischen Connexins 32	42
4	Diskussion	44
4.1	Hepatozelluläre Transplantation im DPPIV⁻-Fischer-344-Tiermodell	44
4.2	Intraportale Transplantation	45
4.3	Integration transplantierter DPPIV⁺-Hepatozyten	46
4.3.1	Migrationsort und Migrationszeitpunkt transplantierter Hepatozyten im Empfängerparenchym	46
4.3.2	Reaktive Prozesse nach hepatozellulärer Transplantation	47
4.3.3	Verbesserung der Integration transplantierter Hepatozyten im DPPIV ⁻ -Ratten-Modell durch exogen zugeführte Pharmaka	51
4.3.4	Sequestration nicht integrierter Spenderhepatozyten	52
4.3.5	Zelladhäsion und Zellkommunikation	53
4.4	Repopulation der Leber	56
4.5	Ausblick	58
5	Zusammenfassung	60
6	Literaturverzeichnis	62

Verzeichnis der Abkürzungen

- Abb Abbildung
- Abs Absatz
- AEC 3-Amino-9-Ethylcarbazol
- Ak Antikörper
- Az. Aktenzeichen
- CAM Cell adhesion molecule
- DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylimdol
- Dil Diocadecyltetramethylindocarbocyaninperchlorat
- DPPIV Dipeptidylpeptidase IV
- EDTA Ethylendiamintetraacetat
- EGTA Ethylenglykoltetraacetat
- FACS fluorescence activated cell sorting
- FITC Fluoresceinisothiocyanat
- FSC Forward lighth scatter
- HBsAg Hepatitis-B-surface-Antigen
- HEPES Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
- HTx Hepatozelluläre Transplantation
- ICAM-1 Intercellular adhesion molecule-1
- IU International units
- KG Körpergewicht
- LDL low density lipoproteins
- OLT Orthotope Lebertransplantation
- PBS Phosphate buffered saline
- SSC Side scatter
- TX Transplantation
- U/min Umdrehungen pro Minute
- V. Vena
- VEGF Vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Leberzelltransplantation als Perspektive für die humane Applikation

Die orthotope Lebertransplantation (OLT) ist gegenwärtig die einzig verfügbare Therapie in fortgeschrittenen Stadien des akuten und chronischen Leberversagens (Henne-Bruns et al. 2003). Der Einsatz der OLT ist allerdings durch den kontinuierlich steigenden Bedarf an Spenderorganen limitiert. Eine Möglichkeit zum alternativen Leberersatz bietet die funktionelle Repopulation des erkrankten Organs durch Transplantation isolierter Hepatozyten.

Es gibt mehrere theoretische Überlegungen, weshalb die Leberzelltransplantation der Ganzorgantransplantation vorzuziehen wäre. Im Gegensatz zur orthotopen Lebertransplantation können durch die Leberzelltransplantation mehrere Patienten von einem Spenderorgan versorgt werden, da zur Zelltransplantation nur ein Bruchteil der gesamten Lebermasse erforderlich ist. Dabei besteht die Möglichkeit, die notwendige Anzahl von Spenderzellen aus einem resezierten Leberlappen eines Familienangehörigen zu gewinnen. Darüber hinaus können Leberzellen auch zur Überbrückung für Patienten dienen, die auf ein Spenderorgan warten. So wird eine längere Wartezeit geschaffen und möglicherweise der eigenen Leber ausreichend Zeit zur Regeneration gegeben (Markus und Becker 1999 a).

Im Vergleich zur OLT stellt die Hepatozytentransplantation einen kleineren und weniger invasiven chirurgischen Eingriff dar. Dabei können die Leberzellen mithilfe eines Venenkatheters in das Pfortadersystem wiederholt injiziert werden (Malhi und Gupta 2001). Bei Nicht-Ansprechen des Empfängerorganismus auf die Therapie mit transplantierten Hepatozyten verbleibt die Möglichkeit der orthotopen Lebertransplantation zu einem späteren Zeitpunkt (Markus und Becker 1999 b). Obwohl für das erfolgreiche Anwachsen allogenen transplantierten Hepatozyten auch immunsuppressive Maßnahmen erforderlich sind, besteht bei der Hepatozytentransplantation aufgrund des geringeren

immunogenen Potentials von reinen Zellen die Möglichkeit, den Gebrauch immunsuppressiver Medikamente und die damit verbundenen Arzneimittelnebenwirkungen zu reduzieren (Allen und Soriano 2001).

Die Aufbewahrung isolierter Hepatozyten kann idealerweise durch Zellkultur oder Kryokonservierung erfolgen (Cho et al. 2004). Dadurch ist ein schneller und unkomplizierter Zugriff auf die Spenderzellen in dringlichen Situationen, wie dem akuten Leberversagen, gewährleistet.

Für die Therapie hereditärer, monogener, metabolischer Erkrankungen, wie insbesondere dem Morbus Wilson (Kupferspeicherkrankheit), dem Crigler-Najjar-Syndrom (idiopathische Hyperbilirubinämie) und der familiären Hypercholesterinämie bietet sich durch Hepatozytentransplantation eine neue Therapiemöglichkeit an. Zur Korrektur dieser Stoffwechseldefekte können gesunde allogene oder durch ex-vivo-Gentherapie veränderte autologe Hepatozyten transplantiert werden. Beispielsweise beschrieben Grossman et al. (1994) erstmalig die Infusion von ex vivo modifizierten autologen Leberzellen bei einem Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie. Nach Aufarbeitung von isolierten Hepatozyten konnte der Gendefekt des Patienten durch Insertion des Wildtyp-Gens für den LDL-Rezeptor mittels eines rekombinanten Retrovirus korrigiert werden.

In der jüngsten Zeit wurden überdies vermehrt humane Applikationen mit allogener Leberzelltransplantation beschrieben (Gupta und Roy Chowdhury 2002). Die erste erfolgreiche Transplantation, durchgeführt von der Arbeitsgruppe Fox et al. (1998), gelang bei einem Mädchen mit Crigler-Najjar Syndrom, dessen Bilirubingesamtwert signifikant gesenkt und deren Krankheitssymptome wesentlich gemindert werden konnten (Grompe 2001).

Neben den erwähnten Versuchen, metabolische Stoffwechseldefekte mit der Leberzelltransplantation zu therapieren, wurden auch Studien an Patienten mit akutem Leberversagen und chronischer Zirrhose unternommen. Strom et al. (1997) transplantierten fünf Patienten mit akutem Leberversagen. Die Übertragung allogener Leberzellen diente hierbei der Überbrückung bis zur OLT und bewirkte eine deutliche Senkung des NH_3 -Spiegels in allen Empfängern (Markus und Becker 1999 b).

Angesichts der erwähnten Vorteile scheint die Leberzelltransplantation eine zukunftssträchtige Perspektive bei der Therapie schwerer Lebererkrankungen. Um ein besseres Verständnis der Integration und sukzessiven Repopulation nach hepatozellulärer Transplantation zu gewinnen, bedarf es der genauen Analyse beteiligter Komponenten und Faktoren. Gegenwärtig gibt es verschiedene Tiermodelle, die zur Klärung der grundlegenden Mechanismen herangezogen werden.

1.2 Experimentelle Tiermodelle

1.2.1 Nachweismethoden transplanteder Hepatozyten

Seit Ende der 70er Jahre werden Hepatozyten in verschiedenen Tiermodellen transplantiert. Die Grundlage für die Leberzelltransplantation wurde durch die Entwicklung der in Abschnitt 2.7.3 beschriebenen Zwei-Schritt-Perfusionstechnik zur Isolierung vitaler Hepatozyten durch Seglen (1976) geschaffen.

Zunächst beschäftigten sich verschiedene Arbeitsgruppen mit dem idealen extrahepatischen Transplantationsort der Leberzelltransplantation, da zur Lokalisation und Identifikation von Spenderzellen in der Empfängerleber spezifische Marker fehlten (Fox und Roy-Chowdhury 2004). So wurde die Implantation von isolierten Leberzellen in verschiedene ektopische Organe versucht, wie z.B. in der Milz (Kusano und Mito 1982), in das Pankreas oder die Peritonealhöhle (Selden et al. 1995). Der lichtmikroskopische Nachweis transplanteder Zellen gelang in diesen Organen durch Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Das Anwachsen und Überleben transplanteder Hepatozyten im organfremden Milieu war durch fehlende hepatotrophe Faktoren limitiert.

In die Milz wurde aufgrund der einfachen Transplantationstechnik und der guten Nachweisbarkeit am häufigsten transplantiert. Dabei zeigten morphologische Untersuchungen, dass transplantede Hepatozyten in der Milz proliferierten und sinusoidale Strukturen ausbildeten (Chen et al. 1994). Außerdem konnte ihre Stoffwechselaktivität mit dem Nachweis von Albumin und leberspezifischer

Enzyme wie der Glucose-6-phosphatase demonstriert werden (Gupta et al. 1994).

Um die transplantierten Hepatozyten auch in der Leber weiter verfolgen zu können, wurden zunächst exogene Zellmarkierungsmöglichkeiten untersucht. Hierzu wurden einerseits Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. Dioctadecyl-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat (Dil) (Markus et al. 1997) oder Carboxyfluorescein und andererseits Radioisotope, wie 111 -Indium oder 99m -Technetium (Gupta et al. 1997), verwendet. So konnten durch die Markierung von Spenderhepatozyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil-18 transplantierte Leberzellen bis zu 40 Tage nachgewiesen werden (Markus et al. 1997). Der wesentliche Nachteil dieser Zellmarkierung besteht darin, dass die in die Ausgangszelle eingebrachten Marker durch metabolische Prozesse abgebaut werden und sich zudem bei der Zellteilung stetig vermindern (Malhi und Gupta 2001).

Anfang der 90er Jahre gelang verschiedenen Arbeitsgruppen ein entscheidender Durchbruch in der Entwicklung von Tiermodellen durch die Verwendung transgener Hepatozyten, wie z.B. HBs-Ag-exprimierender Hepatozyten, die die Lokalisation transplantierte Zellen in der Leber durch in-situ-Färbemethoden ermöglichten (Gupta und Rogler 1999). Diese neueren Verfahren zeigten, dass transplantierte Hepatozyten von der Milz in die Leber abwanderten, dort anwuchsen und somit Versuche zur direkten Leberrepopulation ermöglichten.

1.2.2 Dipeptidylpeptidase IV-Fischer-344-Ratten-Transplantationsmodell

Unter den verschiedenen mutanten bzw. transgenen Tiermodellen erwies sich das Dipeptidylpeptidase IV (DPPIV)-Fischer-344-Ratten-Transplantationsmodell als besonders geeignet. Thompson et al. (1991) wiesen eine spontane Mutation im Gen des Enzyms DPPIV an einem deutschen Zuchtstamm der Fischer-344-Ratten nach. Diese Tiere zeigten trotz Fehlens des Enzyms DPPIV keinerlei Krankheitszeichen und wiesen eine normale Lebenserwartung auf. Die

Exopeptidase DPPIV wird in fast allen Geweben des Körpers exprimiert. Bei reifen, vollständig differenzierten Hepatozyten ist DPPIV apikal in der Plasmamembran lokalisiert und kann mit der Mg^{2+}/K^{+} -ATPase kolokalisiert werden, die einen klassischen Marker für Gallengänge darstellt (Laconi et al. 1998). Die exakte Rolle des Enzyms DPPIV in physiologischen Prozessen ist bis heute nicht geklärt (Malhi und Gupta 2001). In der Immunantwort nimmt DPPIV eine wesentliche Rolle in der T-Zellaktivierung ein und fungiert auch als Regulator der Chemokinfunktion (Dang und Morimoto 2002).

Gupta et al. (1995) entwickelten ein syngenes Transplantationsmodell mit den DPPIV-Fischer-344-Ratten. In diesem Tiermodell wurden Wildtyp-Leberzellen (DPPIV⁺) in DPPIV-defiziente Ratten transplantiert. Der Nachweis der DPPIV⁺-Zellen gelang durch eine einfache histochemische Färbung. Mit diesem neuen Tiermodell konnte erstmalig die erfolgreiche Integration von einzelnen transplantierten Hepatozyten in die Empfängerleber gezeigt werden. Der Anteil integrierter Hepatozyten in einer gesunden Empfängerratte war allerdings gering.

1.2.3 Selektive Leberrepopulation nach Hepatozytentransplantation

Ein grundlegendes Problem der Hepatozytentransplantation stellt die Repopulation der Empfängerleber nach Zelltransplantation dar. Um ein erfolgreiches Anwachsen transplantierte Zellen zu gewährleisten, müssen zwei wesentliche Bedingungen erfüllt sein: Transplantierte Hepatozyten benötigen einerseits einen selektiven Wachstumsvorteil gegenüber den endogenen Hepatozyten und andererseits ist es notwendig, den erforderlichen Raum zur Proliferation der transplantierten Zellen in der Leber zu schaffen (Grompe et al. 1999).

Eine Teilresektion kann die Regeneration der Leber induzieren. Diese Eigenschaft machten sich verschiedene Arbeitsgruppen zur Grundlage der Repopulation durch transplantierte Zellen. Allerdings zeigte sich, dass die verbliebenen Hepatozyten nur zwei Zellteilungszyklen nach einer 2/3-Leberteilresektion durchlaufen müssen, um die Ausgangsmasse der Leber

wiederherzustellen, weshalb per se der Proliferationsstimulus auf die transplantierten Hepatozyten gering ausfällt (Grompe 2001). Und mehr noch, da sowohl auf die endogenen als auch auf die transplantierten Zellen der Proliferationsstimulus gleichermaßen einwirkt, aber die sich implantierenden Zellen deutlich im Nachteil befinden, blieb die erhoffte Repopulation vornehmlich durch transplantierte Hepatozyten aus. Einen ganz neuen Lösungsansatz dieses Problems der Repopulation entwickelten Laconi et al. (1995) mit der Verabreichung von Lasiocarpine, einem Pyrrolizidin-Alkaloid, zur Vorbehandlung der Empfängertiere. Diese Substanz blockiert den hepatischen Zellzyklus der endogenen Hepatozyten und beschädigt die zelluläre DNA, wobei die Funktion der Hepatozyten erhalten bleibt. Nach Austausch dieser sehr toxischen Substanz gegen das verträglichere Pyrrolizidin-Alkaloid Retrorsin konnte die Arbeitsgruppe 1998 eine erfolgreiche Repopulation durch transplantierte Hepatozyten von 40–60% im DPPIV-Fischer-344-Ratten-Transplantationsmodell nach zwei Monaten erzielen (Laconi et al. 1998). Die Injektion von Retrorsin vier und sechs Wochen vor Transplantation sichert dabei eine selektive Proliferation der transplantierten Zellen gegenüber den mitotisch gehemmten, endogenen Hepatozyten in der Empfängerleber. Eine zum Zeitpunkt der Transplantation durchgeführte 2/3-Teilresektion der Leber wird von den Versuchstieren toleriert und stellt gleichzeitig einen mitotischen Stimulus zur Repopulation dar. Da in diesem Modell vornehmlich die transplantierten Hepatozyten mitotische und damit regenerative Kapazität besitzen, eignet sich dieses Modell zur Analyse der Integrations- und Repopulationsmechanismen.

1.3 Integrationsmechanismen transplantierte Zellen

Der Anteil erfolgreich implantierter Zellen nach Hepatozytentransplantation ist relativ gering. Studien zur Repopulation der Leber haben gezeigt, dass nur 20–30% der transplantierten Zellen im Empfängergewebe überleben (Rajvanshi et al. 1996). Die Integrationsmechanismen transplantierte Hepatozyten sind daher von zentraler Bedeutung im Hinblick auf ihre Überlebenschancen.

1.3.1 Kinetik der Integration und Repopulation

In Studien mit radioaktiv markierten Hepatozyten traten 60-90% der in die Milz transplantierten Hepatozyten unverzüglich mit dem portalen Blutstrom in die Leber ein (Ponder et al. 1991). Die transplantierten Hepatozyten verteilten sich anschließend in den Ästen der Pfortader sowie in den hepatischen Sinusoiden. Dabei wurde aufgrund des Größenunterschiedes zwischen Hepatozyten (20-40 μm Durchmesser) und Sinusoiden (7-9 μm Durchmesser) der Großteil (60-70%) der Hepatozyten in den Pfortaderästen reteniert (Rajvanshi et al. 1996). Gupta et al. (1999 a) zeigten, dass nach 24–48 Stunden keine transplantierten Hepatozyten mehr in den Pfortaderästen nachweisbar waren, da sie von den Makrophagen abtransportiert worden waren. Ein kleiner Teil der in den Sinusoiden gelegenen Hepatozyten migrierte 16 bis 20 Stunden nach Transplantation in die Leberplättchen, der größere Teil wurde auch hier durch Makrophagen eliminiert (Gupta et al. 1999 a).

Unter selektiven Proliferationsbedingungen nach Retrorsinvorbehandlung und Leberteilresektion beschrieben Laconi et al. (1998) einzelne Gruppen von bis zu vier DPPIV⁺-Zellen zwei bis vier Tage nach Hepatozytentransplantation. Nach 2 Wochen waren die Cluster bereits auf 25-50 Zellen angewachsen. Das Ausmaß der Hepatozytenrepopulation stieg kontinuierlich an, so dass nach 2 Monaten 40-60% der Hepatozytenmasse durch DPPIV⁺-Spenderzellen und deren Abkömmlinge ersetzt waren.

1.3.2 Rolle von Zelladhäsionsmolekülen

Interzelluläre Verbindungen sind essentiell für den Zusammenhalt von Epithelien und werden durch unterschiedliche Klassen von Zelladhäsionsmolekülen (CAM = engl. Cell adhesion molecule) gebildet (Stamatoglou und Hughes 1994). Insbesondere werden die Cadherine, CAMs aus der Immunglobulin-Großfamilie und die Selektine unterschieden (vgl. Abb. 1). Grundsätzlich vermitteln Cadherine calciumabhängig die homophile Zell-Zell-Adhäsion und damit den Zusammenhalt der epithelialen Zellen, wie z.B. in der Leber oder im Dünndarm (Lodish et al. 2000). Aus Untersuchungen zur

Bildung von Tumoren und Metastasen ist bekannt, dass ein Verlust in der Expression von E-Cadherin ein wichtiger Faktor für die Progressivität und Invasivität der Tumorzellen darstellt (Kohya et al. 2003).

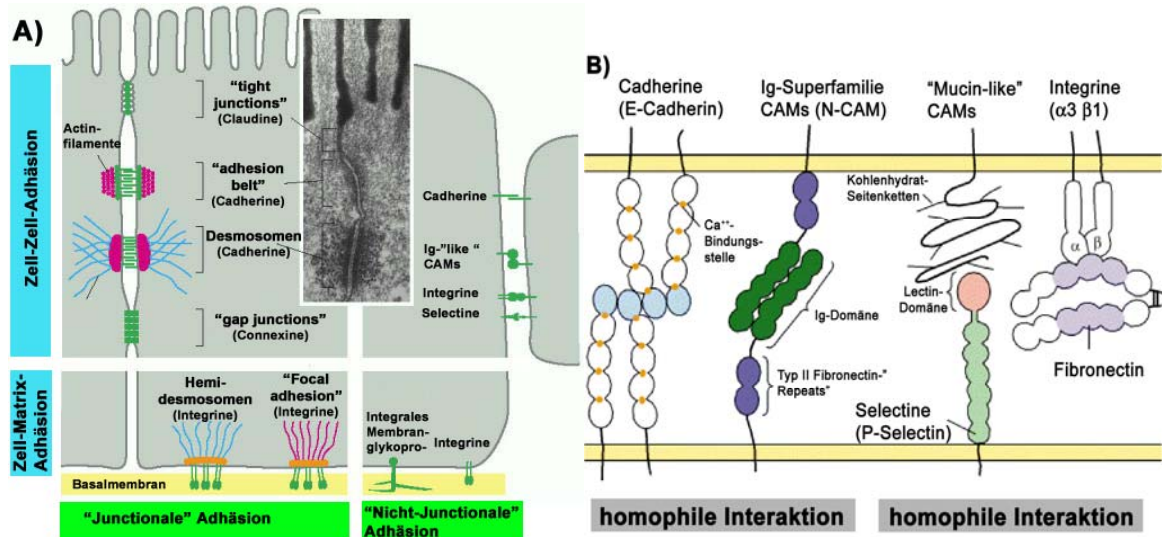


Abbildung 1:

A) Schematische Darstellung der prinzipiellen Zell-Zell-Interaktionen sowie der Zell-Matrix-Adhäsion. Es sind sowohl bei den „junctionalen“ als auch bei den „nicht-junctionalen“ Adhäsionen die beteiligten Moleküle dargestellt. Modifiziert nach Alberts et al. (2002), S. 1088.

B) Überblick über den Aufbau der Haupt-Adhäsionsmoleküle. Es werden die Homodimere bildenden Cadherine sowie Immunglobuline-Superfamilien-CAMs von den Heterodimere bildenden Selectinen und Integrinen unterschieden. Integrine binden z.B. an Fibronectin, Selectine an „Mucin-like“-CAMs. ICAM gehört zur Gruppe der Ig-Superfamilie. E-Cadherin ist das epitheliale Cadherin. Modifiziert nach Lodish et al. (2000), S. 970.

Im Gegensatz zu den Cadherinen vermitteln die CAMs aus der Immunglobulin-Großfamilie die Calcium-unabhängige Zell-Zell-Adhäsion. In der normalen Leber wird das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) nur gering auf Endothelzellen und Kupferzellen exprimiert und ermöglicht u.a. Leukozyten die Adhäsion an das Endothel. Bei Entzündungsreaktionen wird durch die Freisetzung von $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 eine erhöhte Expression von ICAM-1 auf allen hepatischen Zellen induziert. Dies ermöglicht eine vermehrte Ansammlung von Leukozyten im Entzündungsgebiet (Jaeschke 1997).

Für die funktionale Kopplung zweier benachbarter Zellen in einem Gewebe ist der Stoffaustausch untereinander von essentieller Bedeutung. Durch Unwin und

Zampighi (1980) wurden Hexamere von Proteinen beschrieben, die als Connexine bezeichnet in der Plasmamembran zweier benachbarter Zellen einen Kanal zwischen den Zellen bilden und so eine metabolische Kommunikation zweier benachbarter Zellen ermöglichen. Je ein Hexamer aus Connexinen wird als Connexon bezeichnet (vgl. Abb. 2). Zwei Connexone bilden eine ‚gap junction‘ (Alberts et al. 2002, S.1076). Ein Subtyp dieser Connexine, das Connexin 32, ist Hauptbestandteil der hepatischen ‚gap junctions‘ (Piechocki et al. 2000).

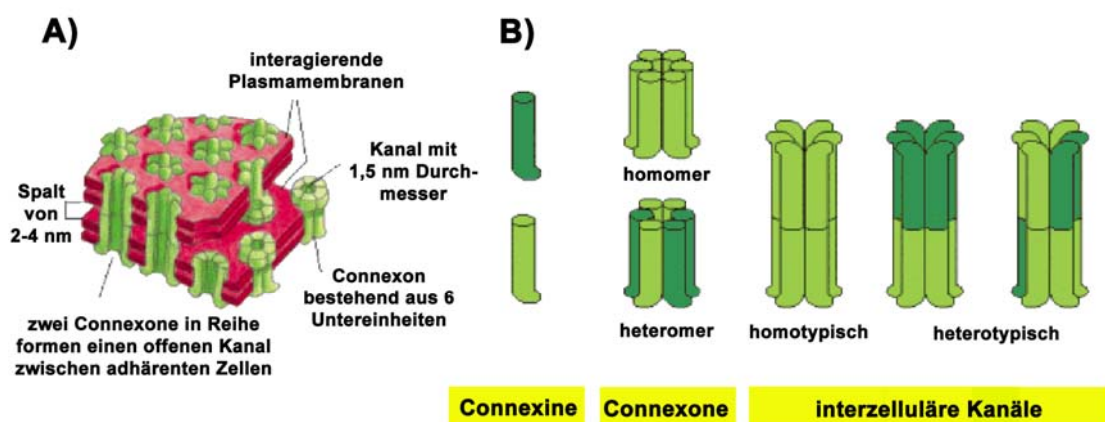


Abbildung 2: Schematische Darstellung der ‚gap junctions‘, modifiziert nach Alberts et al. (2002), S.1076.

- A) Eine dreidimensionale Zeichnung zeigt die Verbindung zweier benachbarter Zellen und des Interzellularspaltes durch ‚gap junctions‘. Jede Plasmamembran (rot) enthält Connexone (grün), von denen jedes Connexon aus 6 Connexin-Untereinheiten besteht. Zwei in Reihe befindliche Connexone überbrücken den interzellulären Spalt und bilden dadurch einen durchgehenden Kanal, der den interzellulären Stoffaustausch ermöglicht.
- B) Einzelne Connexine können zu verschiedenen Connexonen organisiert werden, indem sie sich homomer oder heteromer verbinden. Lediglich die homotypische Verbindung von homomer organisierten Connexonen bilden einen homotypischen interzellulären Kanal, alle anderen Varianten bilden heterotypische Kanäle.

Untersuchungen der Zelladhäsions- und Zellkommunikationsmoleküle nach hepatozellulärer Transplantation und bei der Repopulation des Empfängerorgans wurden bisher noch nicht durchgeführt und sind daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.4 Fragestellung

In bisherigen Transplantationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Repopulation der Empfängerleber durch transplantierte Hepatozyten im Tiermodell möglich ist. Um die Anzahl integrierter und wachsender Spenderhepatozyten zu erhöhen, werden unterschiedliche Leberregenerationsstimuli wie z.B. die partielle Hepatektomie oder toxische Leberschädigung in verschiedenen Tiermodellen angewendet. Die zu Grunde liegenden zellulären Integrationsmechanismen und fördernden Faktoren sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit, die sich im Detail mit folgenden Fragen befasst:

- Ort und Zeitpunkt der Integration transplantierte Hepatozyten
 1. Wo findet die Migration transplantierte Hepatozyten in das Empfängerparenchym statt?
 2. Können Unterbrechungen in der Endothelzellbarriere nach Transplantation beobachtet werden?
 3. Spielen Zelladhäsions- und Zellkommunikationsmoleküle wie Connexin 32, E-Cadherin und ICAM-1 bei der Integration eine Rolle?
 4. Gibt es Zellkontakte zwischen Empfänger- und Spenderhepatozyten und exprimieren die transplantierte Hepatozyten stabile Zelladhäsionsmoleküle?
- Verlauf der Repopulation in der Empfängerleber
 1. Ab wann und mit welcher Kinetik proliferieren transplantierte Zellen?
 2. Wie hoch ist der Anteil transplantierte Hepatozyten in der Leber am Ende des Beobachtungszeitraumes von zwei Monaten?

2 Material und Methoden

2.1 Herstellernachweis der Reagenzien

In den nachfolgend beschriebenen Versuchsdurchführungen wurden die hier aufgeführten Reagenzien verwendet (übliche Bezeichnung der Reagenzien in alphabetischer Reihenfolge):

- AEC 3-Amino-9-Ethylcarbazol: Fa. Merck, Darmstadt
- Alkohol: Ethanol 99,8% absolut, $M = 46,07\text{g/mol}$, Fa. J.T. Bahr, Deventer, Niederlande
- ALTROMIN 1324: Haltungsdiät für Ratten, Fa. Altromin, Lage
- Aqua dest.: gefiltertes Leitungswasser, Filtersystem Mill-Q[®] Reagent Water System, Fa. Millipore Molsheim, Frankreich
- Aquamount: Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Aceton: zur Analyse, Fa. Merck, Darmstadt
- 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid x 2 H₂O: Fa. Serva, Heidelberg
- DAPI 4',6-Diamidino-2-Phenylimdol: Fa. Sigma Chemicals, St. Louis Missouri, USA
- Diethylether: reinst Fa. Merck, Darmstadt
- EDTA Ethylendiamin tetra-acedic acid 99%: Fa. Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- EGTA Ehylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid: Fa. Sigma Chemicals St. Louis, Missouri, USA
- Fast Blue BB: Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Glucose: D(+)-Glucose (Monohydrat), $M=198,17\text{ g/mol}$, Fa. Merck, Darmstadt
- gly-Pro-methoxy- β -naphthylamid: Sigma-Aldrich, Deisenhofen
- Hämatoxylin: Kristallpulver, Fa. Merck, Darmstadt
- Heparin: Liquemin[®] N 2500, Heparin-Natrium 5000 IE/ml, Fa. Novo Nordisk, Mainz

- HEPES N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid): sodium salt $C_8H_{17}NaO_4SNa$, Fa. Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- Hostaket[®]: Ketaminhydrochlorid, Fa. Intervet
- Kaninchenserum: DAKO Corporation, Carpinteria CA, USA
- KCl: Fa. Merck, Darmstadt
- Kollagenase: Fa. Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- Lysostypt[™]: Fa. Braun, Melsungen
- Methylbutanol: Sigma, Deisenhofen
- M.O.M. Blocking Reagent: Fa. Vector Laboratories, UK
- NaCl: isotone Kochsalzlösung 0,9%, Fa. Braun, Melsungen
- $NaHCO_3$: Natriumhydrogencarbonat, $M=84,01$ g/mol, Fa. Merck, Heidelberg
- PBS: Dulbecco's phosphate buffered saline, Fa. Gibco BRL, Wiesbaden-Biebrich
- Percoll: Fa. Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden
- Rattenserum: DAKO Corporation, USA
- Retrorsin: Fa. Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri, USA
- Rompun[®]: Xylozinhydrochlorid, 2%ige Lösung, Fa. Bayer, Leverkusen
- Tabotamp[®]: Resorbierbares Hämostyptikum, Wirkstoff oxidierte regenerierte Cellulose, Fa. Ethicon
- Trypanblau: Fa. Merck, Darmstadt
- Tris/Maleate: Sigma-Aldrich Deisenhofen
- Vectashield[®] Mounting Medium: Vector Laboratories, UK
- Ziegenserum: Dako Corporation, 6392 Via Real Carpinteria, CA 93013, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien für die Zellpräparation und Zelltransplantation

- 10 ml Auslaufpipetten: Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Braunüle[®] Vasofix[®]: (20G und 17G), Fa. Braun, Melsungen
- 50 ml Falcon Röhrchen: Fa. Sarstedt, Nümbrecht
- Einmalspritzen Injekt[®]: (2, 5, 10, 20 ml), Fa. Braun, Melsungen

- Infusionssysteme mit Blasenfalle: Fa. Braun, Melsungen
- Heidelberger Verlängerungen: Fa. Braun, Melsungen
- Kanülen Sterican®: (27G, 22G, 20G), Fa. Braun, Melsungen
- Nalgene Cryoware®: Cryogenic Vials, Fa. Nalge Company, USA
- Neubauerzählkammer: Fa. Brand Gläser, Wertheim
- Perfusorleitungen: Fa. Braun, Melsungen
- Petrischalen: Fa. Greiner Labortechnik, Frickenhausen
- Super Frost® Plus Objektträger und Deckgläser: Menzel Gläser, Braunschweig
- Vicryl®: 3-0 resorbierbares Nahtmaterial, Fa. Ethicon

2.3 Gerätenachweis

- Zentrifuge: Hettich Rotaxia/KS
- Cytospin 2 shandon Pittsburg, USA
- FACS-Gerät: Fluorescence Activated Cell Analyzer No. 80557, Fa. Becton Dickson, San Jose, USA
- Mikroskop: Zeiss Axioskope, Oberkochen
- Ultramikrotom: Cryo-Ultramikrotom, Leica, Wetzlar

2.4 Herstellernachweis der Antikörper

2.4.1 Primärantikörper

Antigen	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
DPPIV (CD 26)	Maus, monoklonal	1:100	BD-Pharmingen OX-61
Connexin 32	Kaninchen, polyklonal	1:5000	Sigma C3595
E-Cadherin	Maus, monoklonal	1:25	Transduction Laboratories C20820
ICAM-1 (CD54)	Maus, monoklonal	1:500	BD-Pharmingen
Anti Endothelium	Maus, monoklonal	1:200	Serotec OX43

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

2.4.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen-anti-Ziege-IgG, Alexa488-gekoppelt	1:400	Alexa Fluor® 488
Ziege-anti-Maus-IgG, Alexa488-gekoppelt	1:400	Alexa Fluor® 488
Ziege-anti-Kaninchen-IgG, Alexa488-gekoppelt	1:400	Alexa Fluor® 488
Kaninchen-anti-Maus-IgG; Alexa555-gekoppelt	1:400	Alexa Fluor® 555
Ziege-anti-Maus-IgG; Alexa555-gekoppelt	1:400	Alexa Fluor® 555
Ziege-anti-Maus-IgG, FITC-gekoppelt	1:500	FITC, Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper

2.5 Verwendete Tiere

Alle Versuche wurden unter Beachtung der Tierschutzbestimmungen beantragt und durch den Präsidenten der Bezirksregierung in Braunschweig genehmigt (Az.:509.42502/01-02.01 vom 29.03.2001) sowie innerhalb der Einrichtungen der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen durchgeführt. Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen in der von Dr. med. vet. K. Nebendahl geleiteten tierexperimentellen Abteilung des Universitätsklinikums Göttingen. Die Ratten erhielten das Standardfutter ‚alltromin-1324-Haltungsdiät für Ratten‘ und Wasser ad libitum.

2.5.1 Spendertiere

Als Spendertiere zur Gewinnung primärer Hepatozyten wurden ca. 8-10 Wochen alte männliche Fischer-344-Ratten (DPPIV⁺) (Charles River, Germany) mit 150-170 g Körpergewicht (KG) verwendet.

2.5.2 Empfängertiere

Als Empfängertiere der hepatozellulären Transplantation dienten DPPIV⁻-Fischerratten von 150-300 g KG, die zwischen 10 und 25 Wochen alt waren. Dieser Zuchtstamm wurde mit Elterntieren von Dr. Ezio Laconi (Cagliari, Italien) etabliert und in der oben genannten tierexperimentellen Einrichtung gezüchtet.

2.6 Schädigung der Rattenleber mit Retrorsin

Retrorsin ist ein in Pflanzen natürlich vorkommendes Pyrrolizidinalkaloid. Dieses Agens blockiert den hepatischen Zellteilungszyklus und wurde den Versuchstieren zweimal im Abstand von 6 und 4 Wochen vor Transplantation intraperitoneal appliziert (vgl. Abb. 3).

Die Retrorsinlösung wurde aus dem käuflichen Retrorsinpulver (Sigma R-0382) wie folgt hergestellt: 50 mg Retrorsin wurden in 5 ml Aqua destillata gelöst; die Lösung anschließend mit 1N HCl auf einen pH Wert von 2,5 eingestellt und nach vollständigem Lösen des Retrorsins mit 1N NaOH wieder auf pH 6,5 adjustiert. Diese Retrorsinstammlösung wurde den Versuchstieren nach Sterilfiltration injiziert. Die applizierte Retrorsinmenge richtete sich nach dem Körpergewicht (KG) der Versuchstiere (30 mg/kg KG).

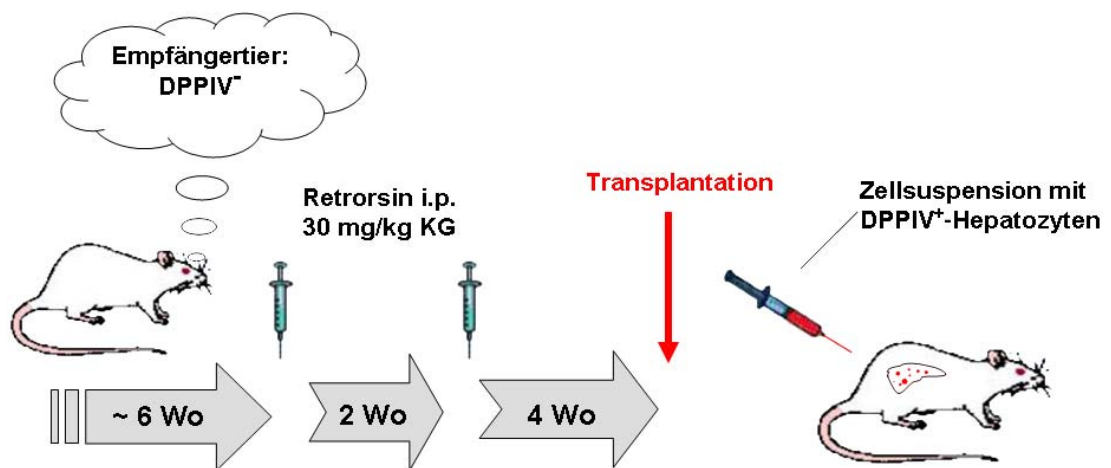


Abbildung 3:

Zeitlicher Verlauf der Stimulation der Empfängerleber mit Retrorsin (vgl. Abschnitt 2.6). DPPIV⁻-Empfängertieren wurden 6 und 4 Wochen vor Transplantation 30mg/kg KG Retrorsin intraperitoneal appliziert.

2.7 Präparation von Hepatozyten aus Rattenleber

2.7.1 Allgemeines

Die Gewinnung von primären Hepatozyten als Spenderzellen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll der In-situ-Perfusionstechnik von Seglen (1976). Bei der Präparation wurde unter aseptischen Bedingungen gearbeitet, was die Sterilfiltration aller Perfusionslösungen sowie das Autoklavieren aller benötigten Geräte beinhaltete. Die anschließende Aufarbeitung der Zellen wurde unter einer Sterilbank (Sterilgard Hood Class II, The Baker Company, Sanford, Maine, USA) durchgeführt.

2.7.2 Herstellung der Perfusionslösung

Zur Präparation von Spenderzellen aus DPPIV⁺-Ratten waren die in Tabelle 2 aufgeführten drei Perfusionslösungen A, B und C erforderlich, welche aus den in Tabelle 1 angegebenen Stammlösungen 1, 2 und 3 hergestellt wurden. Lösung A, eine Ca⁺⁺-freie Spüllösung, diente der Entblutung und Spülung der Leber. Lösung C wurde als reine Waschlösung bei der Aufarbeitung der Zellsuspension verwendet und Lösung B war zur enzymatischen Verdauung des Zellverbandes mittels Kollagenase notwendig. Während der Perfusion wurden die Lösungen in einem Wasserbad konstant auf 37°C temperiert und zusätzlich in einem Glaskolben mit Sauerstoff begast.

Stammlösung	Substanz, Endkonzentration in mM	Menge für 500 ml in g
1	25 NaHCO ₃	21,0
	5,9 KCl	4,39
	0,23 NaH ₂ PO ₄	0,276
	1,2 Na ₂ SO ₄	1,7
	5 HEPES	11,9
	5,5 Glucose	9,9
2	0,115 NaCl	67,21
	0,5 EGTA	1,9
3	0,115 NaCl	67,21
	2,5 CaCl ₂ x2H ₂ O	3,68
	1,18 MgCl ₂ x6H ₂ O	2,4

Tabelle 3 Stammlösungen für die Perfusionslösungen

	Lösung A	Lösung B	Lösung C
Stammlösung 1	25 ml	25 ml	25 ml
Stammlösung 2	25 ml	-	-
Stammlösung 3	-	25 ml	25 ml
Auffüllen mit Aqua dest auf	500 ml	500 ml	500 ml
Kollagenase	-		30-50 mg /100 ml
pH-Wert	7,8	7,4	7,8-7,9

Tabelle 4: Herstellung der Perfusionslösungen

2.7.3 Gewinnung von isolierten Hepatozyten

Der Spenderratte wurde zur Narkose ein Gemisch aus Rompun®/Hostaket® 6 mg Rompun®+75 mg Hostaket/kg KG intramuskulär appliziert. Nach Eintreten der Narkose wurde das Abdomen der Ratte eröffnet. Zunächst wurde die V. cava inferior dargestellt und oberhalb des Abgangs der Nierenvenen mit einem Faden lose angeschlungen. Dann folgte die Präparation der Pfortader, die kurz vor Eintritt in den Leberhilus ebenfalls angeschlungen wurde. Anschließend wurde Heparin mit einer 22G-Kanüle in die V. cava inferior injiziert, um unter Antikoagulation eine bessere Entblutung der Leber zu gewährleisten. Die Perfusion der Leber erfolgte nach Kanülierung der Pfortader mittels Vasotomie. Über diesen Zugang wurde die Leber mit Lösung A bei einer Flussrate von 25-30 ml/min über ca. 10 min blutleer gespült. Zur Druckentlastung des venösen Systems wurde die V. cava inferior gleichzeitig unterhalb des Abgangs der Nierenvenen durchtrennt. Während der laufenden Perfusion wurde der Thorax eröffnet und der rechte Herzvorhof retrograd in Richtung V. cava inferior mit einer 17G-Vasofix-Braunüle® ankanüliert. Nun wurde zusätzlich die V. cava inferior ligiert, so dass ein rezirkulierendes System ausgehend von der Pfortader über die Leber in den rechten Herzvorhof entstand. Nach Ausblutung der Leber wurde die Kollagenase enthaltende Lösung C in das Perfusionssystem hinzugegeben. Für weitere 5-7 min wurde diese Lösung bei gleichbleibender Flussrate rezirkulierend eingeleitet. Die Perfusion wurde beendet, wenn die Leber als Zeichen eines aufgehobenen Gewebeverbandes eine marmorierte Farbe und weichliche Konsistenz aufwies. Die Kanülen wurden entfernt und die Leber vom Hilus ausgehend extirpiert. Die Weiterverarbeitung der Leber erfolgte auf Eis in einer mit vorgekühlter Lösung B gefüllten Petrischale. Um die Hepatozyten aus der Leberkapsel zu lösen, wurde das weiche Parenchym mit einem Plastischaber ausgestrichen. Diese Suspension bestand nun aus Hepatozyten und Stromalzellen, die aber noch grobe Verunreinigungen aus Gefäßresten und ungenügend verdauten Randarealen aufwies. Aus diesem Grund wurde die Zellsuspension über ein Nylonnetz mit einer Maschengröße von 250 µm filtriert (vgl. Abb. 4).

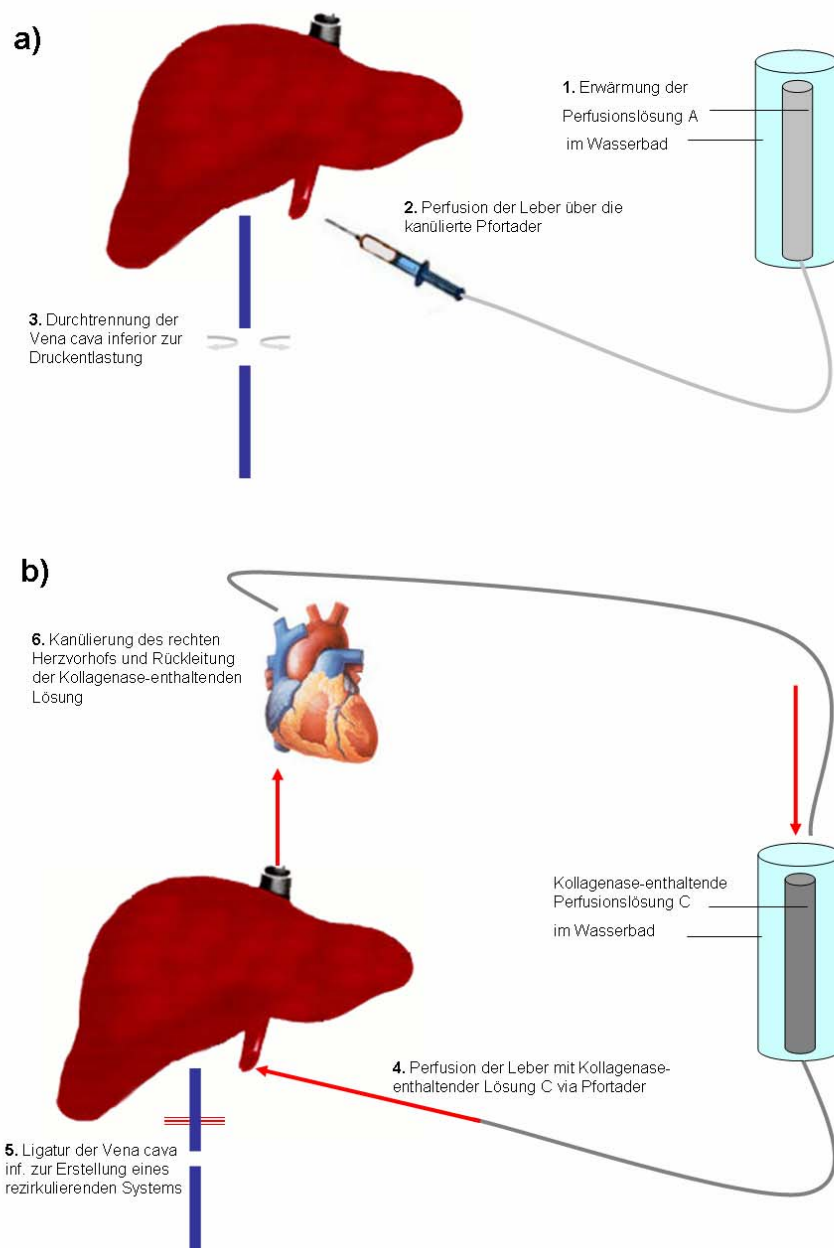


Abbildung 4: Perfusionschema während der Zellpräparation (vgl.2.7.3)

a) Nach Kanülierung der Pfortader wurde die Leber mit der vorgewärmten Kalziumionen-freien Lösung A perfundiert und blutleer gespült. Zur Druckentlastung des venösen Systems erfolgte die Durchtrennung der V. cava inferior unterhalb des Abgangs der Nierenvenen.

b) Im Anschluss an die Perfusion der Leber mit Lösung A erfolgte der Aufbau eines rezirkulierenden Systems mit Lösung C. Dazu wurde der rechte Herzvorhof retrograd in Richtung V. cava inferior kanüliert. Durch Ligatur der V. cava inferior oberhalb des Abgangs der Nierenvenen entstand ein geschlossenes rezirkulierendes Systems. Die Kollagenase enthaltende Lösung C wurde über die Pfortader für 5-7 min rezirkulierend eingeleitet.

2.7.4 Reinigung der Zellsuspension

Zur Reinigung wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcon[®]-Tubes überführt und 5 min bei 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 2-3 ml Lösung B resuspendiert. Das resuspendierte Pellet wurde über 8 ml einer Percolllösung geschichtet und 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand mit Detritus wurde anschließend verworfen und das Pellet mit den vitalen Zellen erneut mit Lösung B aufgenommen. Zur abschließenden Reinigung wurde die Hepatozytenlösung mit Lösung B auf ein Gesamtvolumen von 50 ml aufgefüllt und einer 5 minütigen Zentrifugation bei 500 U/min zugeführt. Das Sediment wurde mit wenig Lösung B (ca. 1-2 ml) resuspendiert, um eine hohe Zelldichte in der endgültigen Hepatozytensuspension zu erhalten. Zur Bestimmung der Vitalität und Anzahl der isolierten Hepatozyten wurden die Zellen mit Trypanblau (0,1 %ig) angefärbt und in einer Neubauerzählkammer lichtmikroskopisch bewertet. Da Trypanblau nur die Membran toter oder stark geschädigter Zellen durchdringt, lassen sich avitale Zellen durch Blaufärbung unterscheiden. Zur Weiterverarbeitung wurde eine Zellvitalität von ~ 80 % als ausreichend angesehen.

2.7.5 Erstellen von Zytospins

Zur Beurteilung der präparierten Zellen wurden Zytospins mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen angefertigt. Die Zentrifugation der Zytospins erfolgte bei 800 U/min für 10 min. Die Objektträger wurden über Nacht luftgetrocknet und anschließend in Aceton für 10 min bei 4°C fixiert.

2.8 Transplantation von Hepatozyten in die Pfortader

2.8.1 Leberteileresektion

Unmittelbar vor der Hepatozytentransplantation wurde bei den Empfängertieren eine Leberteileresektion durchgeführt. Dazu wurden die Tiere mit Diethylether narkotisiert und anschließend das Abdomen in der Medianlinie eröffnet. Der linke obere Leberlappen, der ca. 30% der Lebergesamtmasse beträgt, wurde durch eine basisnahe Ligatur mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 2-0) unterbunden und anschließend herausgetrennt.

2.8.2 Intraportale Transplantation von Hepatozyten

Zur hepatozellulären Transplantation wurde die Pfortader dargestellt und anschließend 8×10^6 Hepatozyten in 300 µl Gesamtvolumen mit einer 28G-Kanüle langsam über 3 min in die Pfortader injiziert. Nach Entfernen der Kanüle wurden Nachblutungen der Punktionsstelle mit einer Lysostypt-Auflage (Fa. Braun) gestillt. Der Wundverschluss erfolgte zweischichtig durch fortlaufende Nähte mit Vicryl. Während der Aufwachphase wurden die Tiere in ihrem Käfig auf einer Wärmeplatte bei 37°C gehalten.

2.9 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben

2.9.1 Organentnahme

Die Organentnahme der Tiere erfolgte in festgelegten Zeitintervallen (30 min, 19 h, 24 h, 3 Tage, 5 Tage, 10 Tage, 21 Tage, 2 Monate). Dazu wurden die Ratten wie unter 2.7.3 beschrieben betäubt. Das Abdomen der Ratte wurde eröffnet und die untere Hohlvene durchtrennt. Die Leber wurde entnommen, gewogen und in Gewebestückchen von ca. 0,5 cm • 0,5 cm Länge zerteilt.

2.9.2 Fixierung der Gewebeproben

Die Gewebeproben wurden in Kryocups aufgenommen und in Methylbutanol überführt. Das Methylbutanol mit darin enthaltenen Kryocups wurde über flüssigem Stickstoff schonend heruntergekühlt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.9.3 Kryoschnitte

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte an einem Ultramikrotom (Leica) bei -20°C. Kryoschnitte von 5 µm Dicke wurden auf Superfrost-Objektträger aufgebracht und über Nacht lichtgeschützt getrocknet. Anschließend wurden sie für 10 min in -20°C kaltem Aceton fixiert und luftgetrocknet. Die Lagerung und Aufbewahrung der Schnitte erfolgte bei -70°C.

2.10 Immunfluoreszenzfärbungen an Kryoschnitten

Zur Detektion der transplantierten Zellen mit bestimmten Markern wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt. Das Prinzip der Immunfluoreszenzfärbungen beruht auf der spezifischen Bindung eines primären Antikörpers an das zu untersuchende Antigen. Die Detektion dieser Bindung erfolgt mittels eines sekundären Antikörpers, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dabei ist der sekundäre Antikörper gegen die Tierspezies des primären Antikörpers gerichtet.

Zur Darstellung der transplantierten Zellen wurde ein Primärantikörper gegen CD26 (siehe Tab. 1) verwendet, der das DPPIV-Antigen auf den Spenderzellen erkennt.

Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe umfassten 2 Farbspektren, wobei die Sekundärantikörper entweder mit Alexa Fluor® 488 oder Alexa Fluor® 555 markiert waren (Tab. 2).

2.10.1 Hintergrundreaktivität

Eine unspezifische Hintergrundreaktivität bei der Färbung kann durch Bindung des Primärantikörpers an geladene Proteine (z.B. Kollagen) des Leberschnittes entstehen. Eine solche falsch-positive Färbung kann durch Inkubation mit einer neutralen Proteinlösung vor Zugabe des Primärantikörpers verhindert werden. Als Proteinlösung wurde Normalserum verwendet aus der selben Tierspezies wie der Sekundärantikörper (Bourne 2000).

Bei Doppelfärbungen mit zwei Primärantikörpern aus der Maus wurde nach Auftragen des ersten Sekundärantikörpers ein spezielles Blockierungsagens (M.O.M.Blocking Reagent, Fa. Vector Laboratories) eingesetzt, um noch freie Maus-Bindungsstellen am ersten Primärantikörper zu blockieren. Zusätzlich wurden spezielle fluoreszenzkonjugierte Sekundärantikörper (siehe Tab. 2) verwendet, um Kreuzreaktionen zu vermeiden.

2.10.2 Färbeprotokolle

Die Färbeprotokolle sind den Abbildungen 5 und 6 zu entnehmen. Als Puffer zum Waschen und Verdünnen wurde Tris-Puffer (0,05 M, pH 7,6) verwendet. Die Inkubationen erfolgten in einer feuchten Kammer.

Die Schnitte wurden zur Kerngegenfärbung mit DAPI, gelöst in Vectashield-Medium, eingedeckelt.

Außerdem wurden in allen Färbeserien Leberschnitte eines DPPIV⁺-Tieres als Positivkontrolle mitgefärbt. Für die Negativkontrollen wurde der Primärantikörper durch Ig-Isotypen ersetzt.

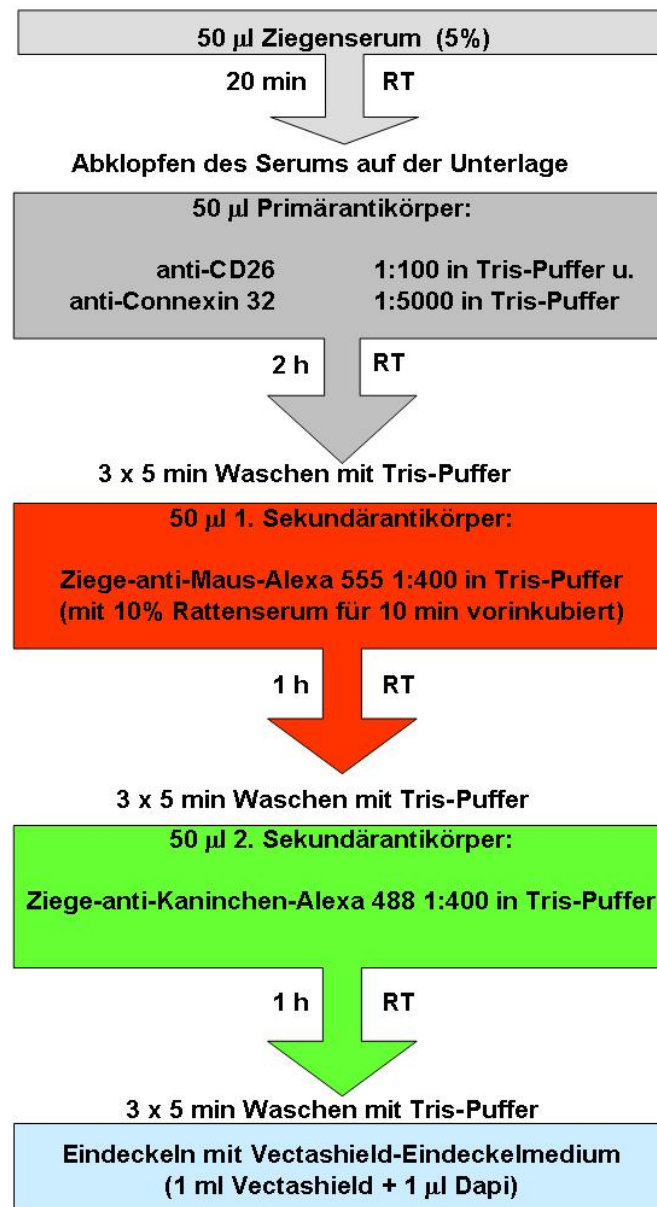


Abbildung 5:

Färbeprotokoll der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von Connexin 32 und CD26 an Kryoschnitten. Die Kryoschnitte wurden bei unterschiedlicher Herkunftsspezies der Primärantikörper mit beiden Antikörpern in einem Schritt inkubiert (Kaninchen-anti-Ratte-Connexin 32 und Maus-anti-Ratte-CD26). Im Anschluss folgte die jeweils separate Inkubation mit dem Spezies-gerichteten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Alexa488=grün und Ziege-anti-Maus-Alexa555=rot). Zum Eindeckeln wurde DAPI mit dem Vectashield-Eindeckelmedium verwendet.



Abbildung 6:

Färbeprotokoll für die Doppelimmunfluoreszenzfärbung von CD26 mit ICAM-1, E-Cadherin oder OX-43. Die Kryoschnitte wurden zuerst mit dem Primärantikörper anti-ICAM-1, anti-E-Cadherin oder anti-OX-43 inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Alexa488 = grün). Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mittels einer einstündigen M.O.M.-Serum-Inkubation konnte im 2. Schritt die Färbung mit dem Primärantikörper anti-CD26 fortgesetzt werden. Die Inkubation mit dem zweiten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Alexa555 = rot) erfolgte über Nacht bei 4°C. Zum Eindeckeln wurde Vectashield-Eindeckelmedium verwendet, das DAPI zur Markierung der Zellkerne enthält.

2.11 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Die fluoreszenzgefärbten Kryoschnitte wurden an einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) untersucht. Zur Identifikation der DPPIV⁺-Zellen wurde ein Rhodamin-Filter (546nm Bandpass Exzitation, 580 nm Farbteiler, >590 nm Langpass Emission) benutzt, wohingegen angefärbte Zelladhäsions- und Kommunikationsproteine mit dem FITC-Filter (450 –490 nm Bandpass Exzitation, 510 nm Farbteiler, 515-565 nm Bandpass Emission) sichtbar gemacht werden konnten. Die Kernfärbung mit DAPI wurde im DAPI-Filter (bei 350 nm) betrachtet.

2.12 Histochemische Detektion der transplantierten Zellen an Kryoschnitten

Zur lichtmikroskopischen Detektion der transplantierten Zellen wurde bei der Färbung die enzymatische Aktivität der Dipeptidylpeptidase IV ausgenutzt, die durch Umsetzung des Substrates in Puffer P' einen roten Farbumschlag auslöste.

Puffer P:	100 mmol/l	Tris-Maleate pH 6,5
Puffer P':	100 mmol/l	NaCl
	1 mg/ml	Fast Blue BB
	0,5 mg/ml	gly-Pro-methoxy-β-naphthylamid
	in Puffer P	

Kryoschnitte wurden nach 5 minütiger Fixierung in eiskaltem Aceton luftgetrocknet. Anschließend folgte ein 5 minütiger Waschschrift in eiskaltem 95%igem Ethanol und ebenfalls eine Luftrocknung. Danach wurden die Schnitte mit 100 µl Puffer P' für 30 min inkubiert und in PBS gewaschen. Nach Gegenfärbung der Kerne im Hämatoxylin wurden die Schnitte abschließend für

5 min in 10%igen Formalin fixiert und danach mit Aquamount eingedeckelt. Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter einem Lichtmikroskop (Axioskop, Zeiss).

2.13 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation erfolgte digital am Mikroskop (Axioskop, Zeiss) durch eine computergesteuerte Kamera und mit Hilfe eines entsprechenden Softwareprogrammes der Fa. Leica (Leica DC100 Version 2.51). Bei den Fluoreszenzaufnahmen wurden die einzelnen Farben entsprechend der Filter separat fotografiert und anschließend mit der Software von Adobe Photoshop 6.0 übereinander projiziert.

2.14 Analyse im Durchflusszytometer (FACS)

Zur quantitativen Bestimmung der Repopulation der Empfängertiere mit DPPIV⁺-Zellen wurde eine FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) durchgeführt.

2.14.1 Aufarbeitung der Zellsuspension für die FACS-Analyse

2 Monate nach Transplantation wurde aus den Empfängertieren eine Leberzellsuspension, wie unter 2.7.3 beschrieben, zur Aufarbeitung gewonnen. Anschließend wurden 1×10^6 Hepatozyten in 50 μ l aufgenommen und mit dem Primärantikörper anti-CD26 (siehe Tab. 1 Primärantikörper) in einer Endkonzentration von 0,5 μ g/ml für 20 min bei RT inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit PBS und die anschließende Inkubation mit dem FITC gekoppelten Sekundärantikörper für weitere 20 min.

Für die FACS-Analyse wurden die Voreinstellungen am FACS-Gerät durch Messung einer ungefärbten Hepatozytenlösung standardisiert. Durch Veränderungen der Empfindlichkeit im Vorwärtsstreulicht (engl.: forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (engl.: side scatter, SSC) wurde die Hepatozytensuspension in eine festgelegte Position in der FSC-korrelierten SSC-Box-Plot-Darstellung gebracht. Anschließend wurde die Antikörper-

markierte Hepatozytensuspension gemessen, wobei anhand der Fluoreszenzintensität zwei unterschiedliche Hepatozytenpopulationen (DPPIV⁺ und DPPIV⁻) abgrenzbar waren. Die Auswertung erfolgte mit einer FACS-Software von Apple.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der präparierten Spenderhepatozyten vor Transplantation mittels Zytospin

Zur morphologischen Beurteilung und Qualitätskontrolle der isolierten Spenderhepatozyten vor Transplantation wurden Zytospins angefertigt und mit einem Antikörper gegen DPPIV dargestellt (siehe Abschnitt 2.10). Es fanden sich fast ausschließlich intakte Spenderhepatozyten, zu erkennen an der mittels Immunfluoreszenz rot angefärbten, unversehrten Zellmembran. Die Hepatozyten weisen auch die für sie typische mono- und binukleäre Struktur auf. Es fanden sich keine stark deformierten Zellen (vgl. Abb. 7).

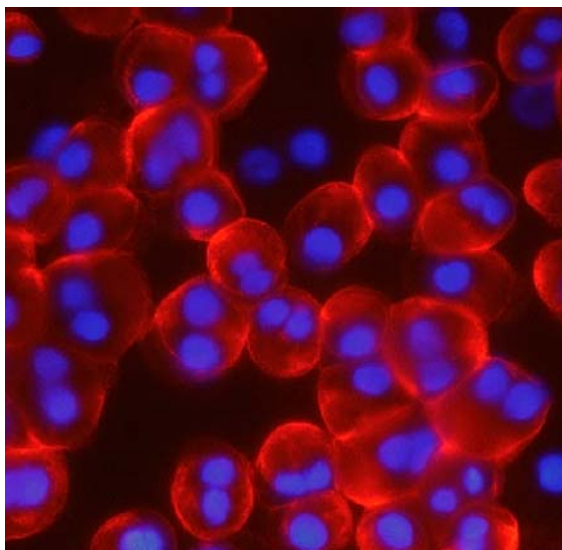


Abbildung 7

Immunfluoreszenz-Darstellung eines Zytospins von DPPIV⁺-Spenderhepatozyten nach Zellisolierung. In roter Fluoreszenz dargestellt sind DPPIV⁺-Spenderhepatozyten. Die Zellmembran ist besonders kontrastreich gefärbt, da DPPIV ein membranständiges Protein ist. Die Zellkerne sind durch die DAPI-Färbung blau markiert (Originalvergrößerung x400).

3.2 Integration und Repopulation von Spenderzellen in der Empfängerleber

Insgesamt wurden in 37 Empfängertieren (Fischer-344-DPPIV-Ratten) nach Retrorsinbehandlung je 8×10^6 DPPIV⁺ Spenderhepatozyten in die Pfortader transplantiert nach zuvoriger 30%iger Hepatektomie (vgl.2.8).

3.2.1 Nachweis von Spenderhepatozyten zum frühen Zeitpunkt nach Transplantation im Empfängerparenchym

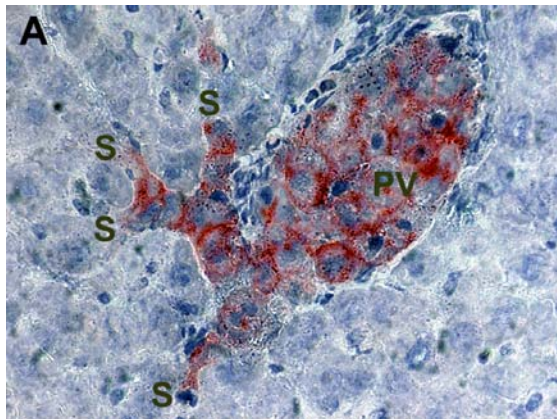
In Folge der intraportalen Injektion verteilten sich die Spenderhepatozyten mit dem portalen Blutstrom und wurden über einen Zeitraum von 30 min bis zu 2 Monaten nach Transplantation nachgewiesen.

In Abbildung 8A ist die histochemische Färbung einer Empfängerleber 30 min nach Transplantation dargestellt. Spenderhepatozyten waren bereits zu diesem frühen Zeitpunkt in den kleinen, distalen Ästen der Portalvene zu finden, wo sie sich zu einem Mikroembolus zusammenlagerten. Daneben ließen sich einige transplantierte Hepatozyten noch weiter distal in den hepatischen Sinusoiden lokalisieren. Die Spenderhepatozyten blockierten hier aufgrund ihrer Größe von 15-20 μm die relativ kleineren Sinusoide ($\sim 10 \mu\text{m}$). Zu diesem frühen Zeitpunkt waren noch keine isolierten Spenderhepatozyten im Parenchym der Empfängerleber nachweisbar.

Zu beobachten war eine diffuse DPPIV-Färbung sowohl im Zytoplasma, als auch in der Zellmembran. Die DPPIV-Aktivität integrierter und metabolisch aktiver Zellen dagegen war polarisiert und nur innerhalb der basolateralen Membran zu finden.

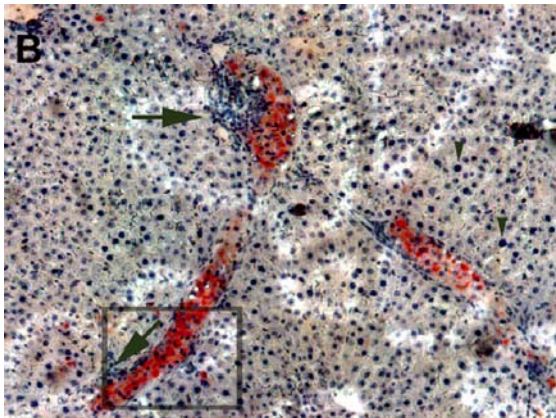
Bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transplantation konnte der Übertritt einzelner Spenderzellen in das Parenchym im Bereich der Portalfelder beobachtet werden (Abb. 8B und 8C). Während die Portalgefäße zu diesem Zeitpunkt noch mit transplantierten Hepatozyten ausgefüllt waren, ließen sich periportal entzündliche Infiltrate nachweisen. Des Weiteren zeigt die Abbildung 8B im Empfängerparenchym hepatozytäre Megalozyten, die durch die Zellteilungsunfähigkeit der endogenen Hepatozyten nach Retrorsin-Vorbehandlung entstanden sind.

Ab dem 3. Tag nach Transplantation konnten keine Spenderzellen mehr in Portalgefäßen beobachtet werden. Ferner bildeten sich die Entzündungsinfiltrate bis zum 7. Tag nach Transplantation zurück.

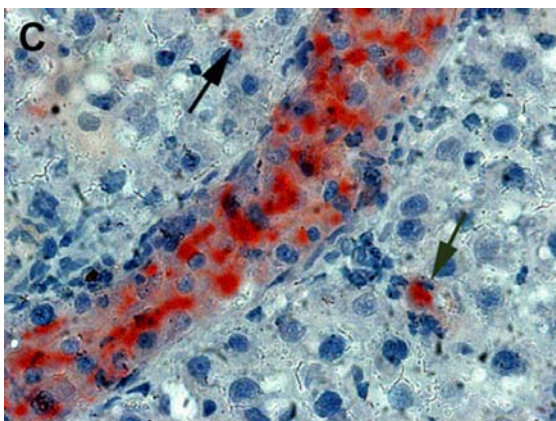
**Abbildung 8**

Histochemische DPPIV-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation: Darstellung der DPPIV⁺-Spenderhepatozyten in Rot.

A: 30 min nach Transplantation befanden sich die transplantierten Hepatozyten ausschließlich in der Portalvene (PV) und den distal davon gelegenen Sinusoiden (S). Im Leberparenchym waren noch keine transplantierten Zellen nachweisbar (Originalvergrößerung x400).



B: 24 h nach Transplantation waren die Portalgefäße noch mit Spenderhepatozyten gefüllt. Um die Portalgefäße kam es zur Anlagerung von Entzündungsinfiltraten (Pfeile). Die Pfeilspitzen markieren Megalozytenbildung im Empfängerparenchym (Originalvergrößerung x100).



C: Ausschnittsvergrößerung von Bild 2B. Einzelne Spenderhepatozyten waren bereits in das Empfängerparenchym migriert (Pfeile). Die Mehrheit transplantierte Hepatozyten verblieb im Gefäßsystem. Zu diesem Zeitpunkt war die DPPIV-Färbung noch homogen über die gesamte Zelle verteilt (Originalvergrößerung x400).

3.2.2 Kinetik der Repopulation

Nach erfolgreicher Integration der Spenderzellen beginnt der Repopulationsprozess.

In Abbildung 9A sind DPPIV⁺-Spenderhepatozyten fünf Tage nach Transplantation dargestellt. Es konnten Ansammlungen von bis zu 3 DPPIV⁺-Hepatozyten in einer Schnittebene als Ausdruck der beginnenden Repopulation nachgewiesen werden. Als Zeichen der erfolgreichen Integration im Empfängerparenchym war die sichelförmige Polarisierung von DPPIV in Spenderhepatozyten und deren Abkömmlingen in der basolateralen Zellmembran zu beobachten (Abb. 9B).

Die einzelnen Cluster DPPIV⁺-Hepatozyten wuchsen ausgehend von der Periportalregion auf die Zentralvene zu. Dabei vermehrte sich die Anzahl der Spenderzellen und deren Abkömmlinge nach Transplantation kontinuierlich. So konnten bereits nach 10 Tagen Cluster von bis zu 20 DPPIV⁺-Hepatozyten als maximale Größe pro Schnittebene nachgewiesen werden (Abb. 9C). Im Verlauf von 2 Monaten nach Transplantation vergrößerten sich die einzelnen Cluster zu konfluenten Anhäufungen von über 200 DPPIV⁺-Hepatozyten (Abb. 9D/E).

Während dieses Repopulationsprozesses konnten zu keiner Zeit Unterschiede in Morphologie und Zellgröße zwischen Spender- und intakten Empfängerhepatozyten beobachtet werden. Des Weiteren behielt das Empfängergewebe jederzeit seine gleichmäßige Architektur ohne Zeichen eines verdrängenden Wachstums durch die Spenderzellen (Abb. 9A). Die Gleichmäßigkeit des repopulierten Leberparenchyms zeigte sich auch auf ungefärbten Kryoschnitten, in denen nicht zwischen neu besiedelten und endogenen Regionen unterschieden werden konnte.

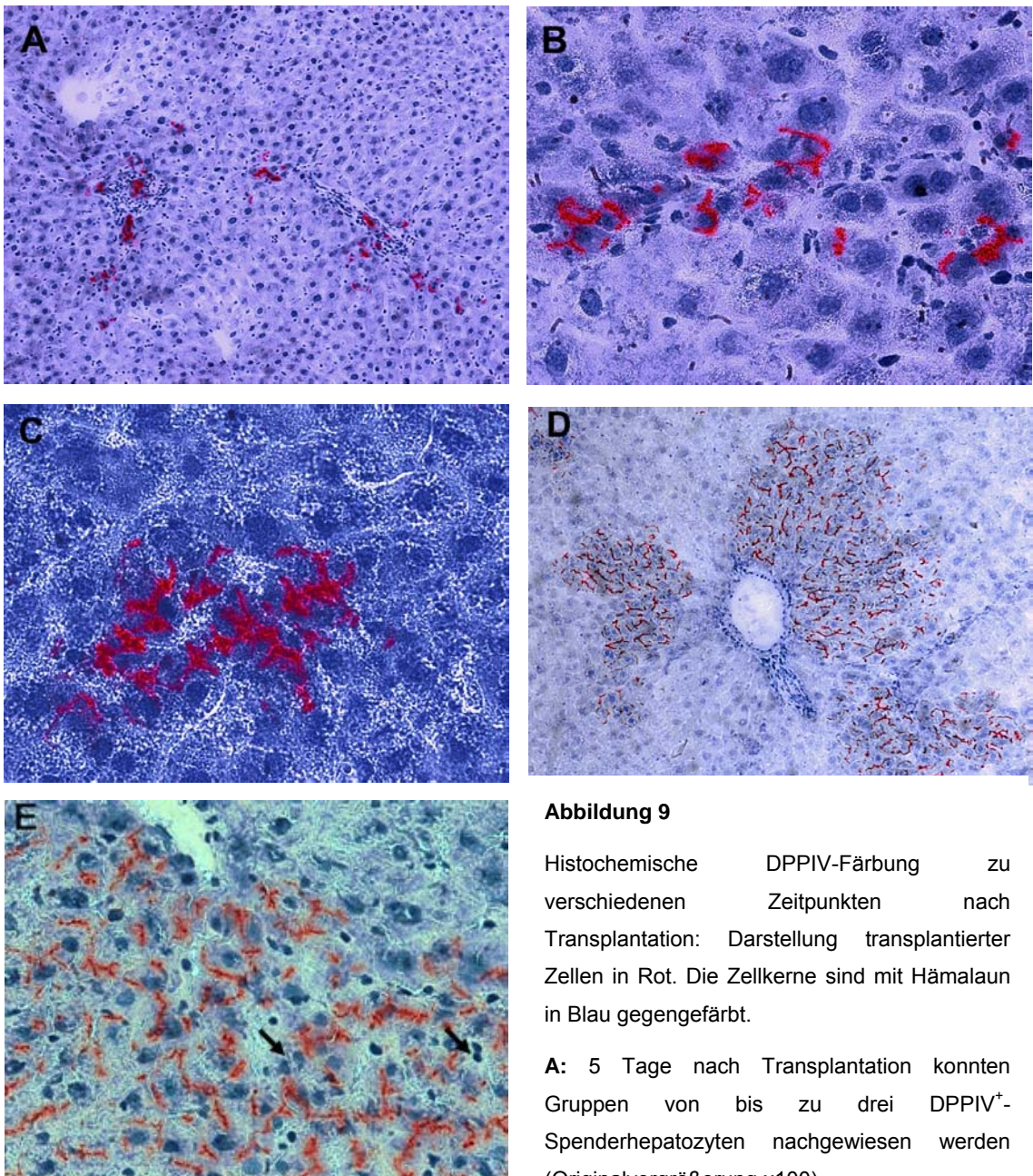


Abbildung 9

Histochemische DPPIV-Färbung zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation: Darstellung transplanteder Zellen in Rot. Die Zellkerne sind mit Hämalaun in Blau gegengefärbt.

A: 5 Tage nach Transplantation konnten Gruppen von bis zu drei DPPIV⁺-Spenderhepatozyten nachgewiesen werden (Originalvergrößerung x100).

B: 5 Tage nach Transplantation wiesen die Hepatozyten eine deutlich polarisierte DPPIV-Färbung in der basolateralen Zellmembran auf (Originalvergrößerung x400).

C: 10 Tage nach Transplantation waren proliferierte Cluster mit bis zu 20 DPPIV⁺-Hepatozyten nachweisbar (Originalvergrößerung x400).

D: 2 Monate nach Transplantation ließen sich große konfluente Cluster DPPIV⁺-Hepatozyten von bis zu 200 Zellen in der Schnittebene anfärben. Die Cluster wuchsen ausgehend von der Periportalregion. (Originalvergrößerung x100).

E: 2 Monate nach Transplantation Darstellung eines großen Clusters von Spenderhepatozyten und ihren Abkömmlingen; deutlich erkennbar waren ein- und auch zweikernige Hepatozyten (Pfeilspitzen) (Originalvergrößerung x400).

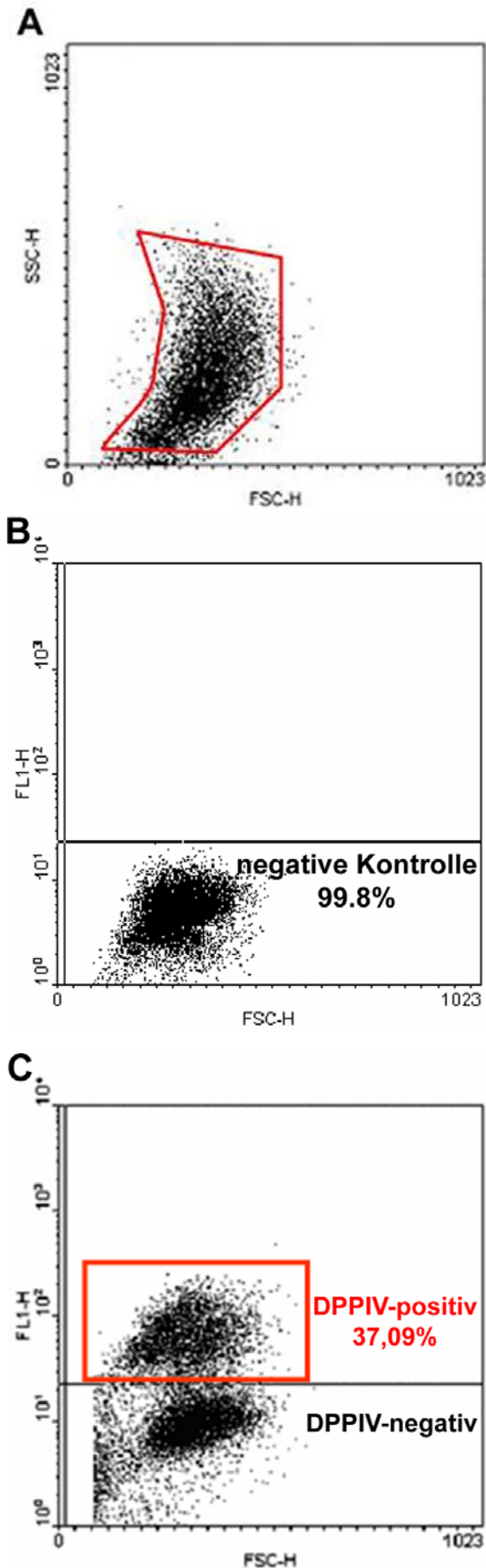
3.2.3 Quantitative Analyse der Repopulation

Neben dem qualitativen Nachweis von Spenderhepatozyten mittels immunhistochemischer Verfahren wurde die genaue Anzahl integrierter Spenderhepatozyten in der Empfängerleber durch FACS-Analyse bestimmt.

Aus jeweils drei transplantierten Ratten zum Zeitpunkt von zwei Monaten nach Transplantation wurden Hepatozyten durch eine In-situ-Kollagenase-Perfusion gewonnen. Nach Markierung mit einem FITC-gekoppelten Antikörper gegen das zellmembranständige CD26 (DPPIV⁺) konnten Spenderzellen durchflusszytometrisch identifiziert werden.

Zunächst wurde das „Fenster“ (gate) der vitalen intakten Zellpopulation bestimmt (Abb. 10A). Anschließend wurde an einer ungefärbten Zellpopulation die Eigenfluoreszenz der Hepatozyten ermittelt, so dass im Folgenden eine Diskriminierung zwischen transplantierten und endogenen Hepatozyten anhand der Fluoreszenzintensität gelang (Abb. 10B).

Eine repräsentative FACS-Analyse zum Zeitpunkt 2 Monate nach Transplantation in (Abb. 10C) zeigte, dass 37% der Lebermasse von transplantierten DPPIV⁺-Hepatozyten repopuliert wurde. Die Dot-Plot-Darstellung der FACS-Analyse in Abbildung 10C zeigte, dass sich die Mehrheit der DPPIV⁺- und DPPIV⁻-Hepatozyten in der Größe nicht unterscheidet. Bei genauer Betrachtung der Verteilung in x-Achsen-Richtung fällt jedoch auf, dass in der Fraktion der DPPIV⁺-Hepatozytenpopulationen auch einige kleinere Zellen anzutreffen sind, während umgekehrt unter den DPPIV⁻-Hepatozyten größere Einzelzellen imponieren.

**Abbildung 10:**

A: FACS-Analyse einer ungefärbten Hepatozytensuspension zur Größenbestimmung der Hepatozyten und Eingrenzung der vitalen Zellen. Die Größe der Hepatozyten wurde auf der x-Achse (forward scatter) gegen die Granularität auf der y-Achse (sideward scatter) aufgetragen. Dargestellt ist das Fenster (gate) (rot), in dem sich die vitalen Hepatozyten befinden.

B: FACS-Analyse einer ungefärbten, vitalen Hepatozytensuspension, in der das Autofluoreszenzlimit mit 99,8% festgesetzt wurde. Die Zellgröße (forward scatter) wurde auf der x-Achse aufgetragen und der Fluoreszenzintensität auf der y-Achse gegenübergestellt.

C: Repräsentative FACS-Analyse einer repopulierten Empfängerleber 2 Monate nach Transplantation. Gemäß dem in Abb. 4B bestimmten Autofluoreszenzfenster (negative Population) fanden sich die positiven Zellen oberhalb der gesetzten Linie. Es ließen sich 37,09% DPPIV⁺-Zellen quantifizieren. Aus der horizontalen Verteilung der Zellen konnte die relative Größe der Hepatozyten abgelesen werden. Die DPPIV⁺-Zellpopulation zeigte vereinzelt auch kleinere Hepatozyten während die DPPIV⁻-Population einige größere Zellen enthielt.

3.2.4 Übertritt transplanteder Hepatozyten durch die Endothelzellbarriere

Beim Übertritt transplanteder Hepatozyten aus dem Gefäßsystem in das Empfängerparenchym musste die Endothelzellbarriere überwunden werden. Um diese genauer zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzlokalisationen mit einem Antikörper (OX-43) gegen portale und sinusoidale Endothelzellen durchgeführt (Abb.11).

Direkt nach der Transplantation stellten sich die Äste des Portalgefäßsystems gefüllt mit Spenderhepatozyten dar. Ein kleiner Teil der im Gefäßsystem eingeschlossenen Spenderzellen überwand während der ersten 19 Stunden nach Transplantation die Endothelzellbarriere (Abb. 11A/B). Dabei konnte gezeigt werden, dass Spenderhepatozyten nicht nur aus den Sinusoiden (Abb. 11A), sondern auch direkt aus Ästen der Portalvene die Endothelzellbarriere passieren (Abb. 11B). Des Weiteren zeigt die Abb. 11B deutliche Unterbrechungen im Endothel der Portalvenenäste, die durch die Penetration der Spenderzellen entstanden sind.

Der Übertritt einzelner Spenderhepatozyten konnte bis zu 24 Stunden nach Transplantation nachgewiesen werden, der Hauptanteil der Spenderhepatozyten verblieb im portalen Gefäßsystem ohne Aussicht auf Integration in das Empfängerparenchym.

21 Tage nach Transplantation präsentierte sich das Endothel in der Nähe der DPPIV⁺-Hepatozytencluster vollständig intakt und unversehrt (Abb. 11D). In räumlicher Assoziation zu gebildeten Spenderhepatozyten fanden sich Sinusoide der Empfängerleber (Abb 11C/D).

Zwei Monate nach Transplantation ließen sich große DPPIV⁺-Hepatozytencluster beobachten, die endogene Portalgefäße umschließen (Abb. 11E).

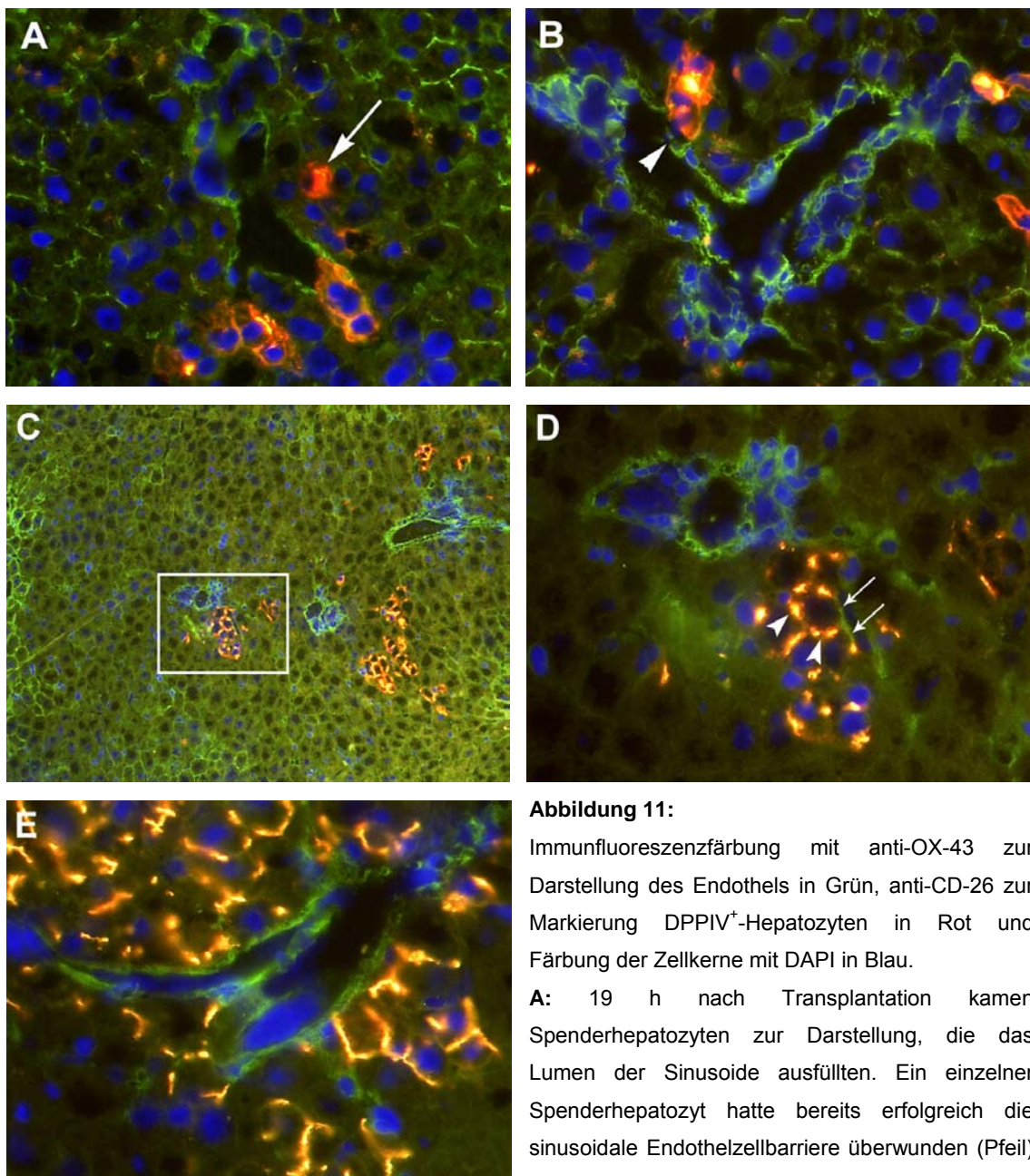


Abbildung 11:

Immunfluoreszenzfärbung mit anti-OX-43 zur Darstellung des Endothels in Grün, anti-CD-26 zur Markierung DPPIV⁺-Hepatozyten in Rot und Färbung der Zellkerne mit DAPI in Blau.

A: 19 h nach Transplantation kamen Spenderhepatozyten zur Darstellung, die das Lumen der Sinusoide ausfüllten. Ein einzelner Spenderhepatozyt hatte bereits erfolgreich die sinusoidale Endothelzellbarriere überwunden (Pfeil) (Originalvergrößerung x400).

B: 19 h nach Transplantation traten Spenderhepatozyten auch direkt aus dem Portalgefäß in das Empfängerparenchym über. Deutlich erkennbar waren an dieser Stelle Unterbrechungen im Endothel (Pfeilspitze) (Originalvergrößerung x400).

C: 21 Tage nach Transplantation fanden sich in den Portalregionen gebildete Cluster DPPIV⁺-Hepatozyten (Originalvergrößerung x100).

D: Die Ausschnittsvergrößerung zu Abb. 5C zeigte im Portalfeld eine intakte Endothelschicht. Außerdem lagerten sich Spenderhepatozyten direkt an sinusoidale Endothelzellen (Pfeil) der Empfängerleber an (Originalvergrößerung x400).

E: 2 Monate nach Transplantation umschließen große Cluster von Spenderhepatozyten die endogenen Portalgefäße (Originalvergrößerung x400).

3.3 Analyse der interzellulären Kommunikation (Adhäsion) während des Integrations- und Repopulationsprozesses

In den folgenden Abschnitten wurden die an der Integration von Spenderhepatozyten beteiligten Faktoren analysiert. In Analogie des Übertritts von Immunzellen aus dem zirkulierenden Blut (Diapedese) sollte hierbei die Beteiligung von Zelladhäsionsmolekülen während des Integrations- und Repopulationsprozesses transplantiert Hepatozyten untersucht werden. Zusätzlich wurde analysiert, inwiefern die integrierten und repopulierenden Hepatozyten mit endogenen Hepatozyten in Kontakt treten, oder ob sie eigene funktionell unabhängige Cluster in der Empfängerleber bilden. Dazu wurden die hepatischen Connexin-vermittelten Zell-Zell-Kontakte untersucht.

3.3.1 Analyse der Rolle von ICAM-1

Zunächst wurde eine mögliche Veränderung der Oberflächenpräsenz des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 der Immunglobulinsuperfamilie mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Dabei zeigte Abb. 12A/B (30 min nach Transplantation) ICAM-1 vermittelte Zellkontakte im Empfängerparenchym und auf Spenderzellen. Auch bereits integrierte Spenderzellen wiesen 3 Tage nach Transplantation ein regelmäßiges Expressionsmuster von ICAM-1 auf der Zellmembran auf (Abb. 12C/D). Ebenso ließen sich 2 Monate nach Transplantation vollständig integrierte Zellcluster DPPIV⁺-Hepatozyten mit einem kontinuierlichen Nachweis von ICAM-1 auf der Zellmembran darstellen (Abb. 12E). Beim mikroskopischen Vergleich der Immunfluoreszenzfärbungen verschiedener Zeitpunkte nach Transplantation konnten also keine sichtbaren Veränderungen im Expressionsmuster von ICAM-1 auf hepatischen Endothelzellen sowie endogenen Hepatozyten nachgewiesen werden.

Zur Kolo-kalisation der Spenderzellen mit ICAM-1 wurden in der Immunfluoreszenz mehrere Farbkanäle benutzt, die bei der Dokumentation zur besseren Gegenüberstellung getrennt photographiert wurden. So stellt Abb. 12B den korrespondierenden Ausschnitt zu Abb. 12A und Abb. 12 D den korrespondierenden Ausschnitt zu Abb. 12C dar.

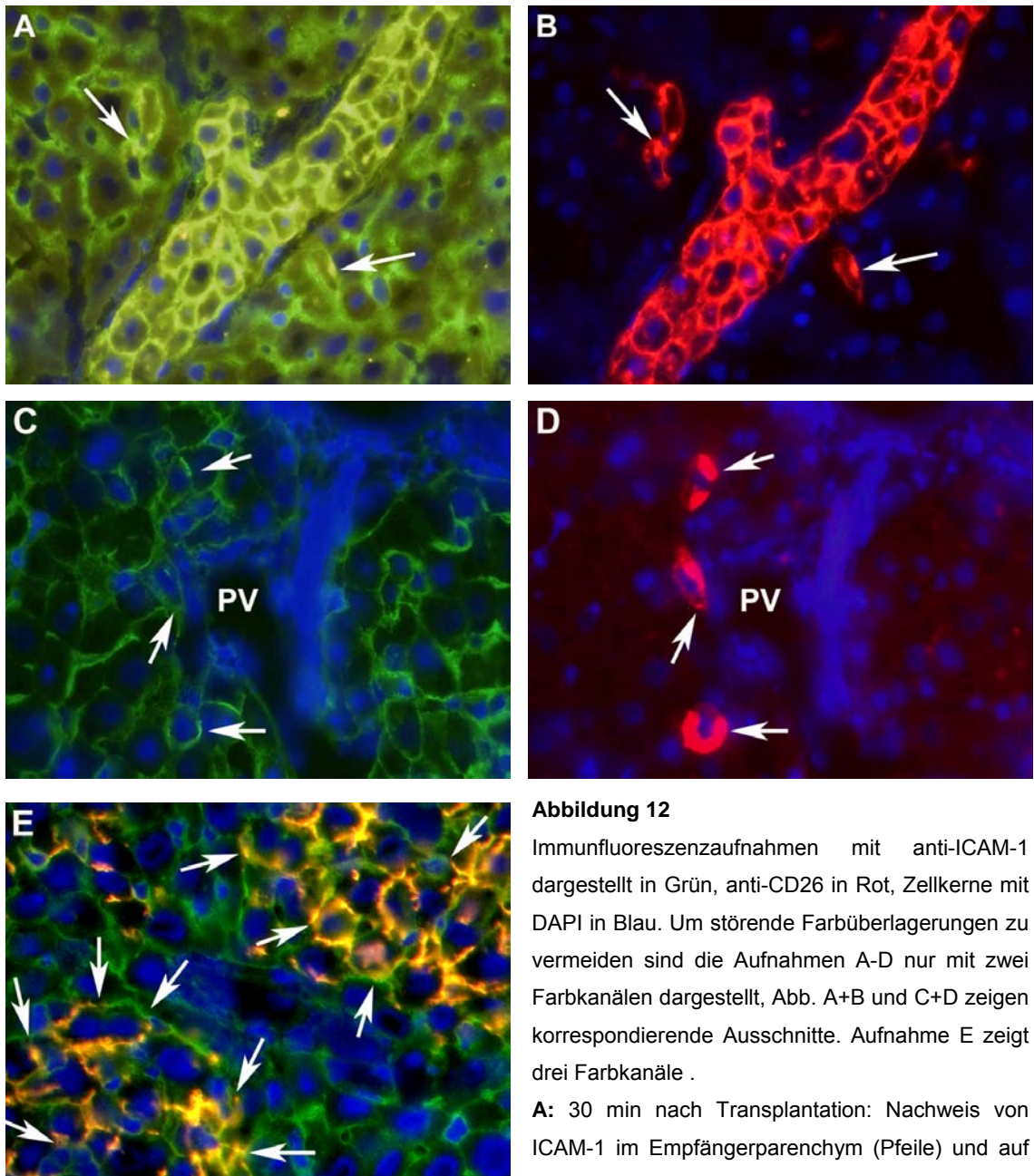


Abbildung 12

Immunfluoreszenzaufnahmen mit anti-ICAM-1 dargestellt in Grün, anti-CD26 in Rot, Zellkerne mit DAPI in Blau. Um störende Farbüberlagerungen zu vermeiden sind die Aufnahmen A-D nur mit zwei Farbkanälen dargestellt, Abb. A+B und C+D zeigen korrespondierende Ausschnitte. Aufnahme E zeigt drei Farbkanäle .

A: 30 min nach Transplantation: Nachweis von ICAM-1 im Empfängerparenchym (Pfeile) und auf Spenderhepatozyten (Originalvergrößerung x400).

B: Im korrespondierenden Ausschnitt wurden Spenderhepatozyten im Portalgefäß und in angeschnittenen Sinusoiden dargestellt (Originalvergrößerung x400).

C: 3 Tage nach Transplantation ließen sich Zellkontakte durch den Nachweis von ICAM-1 auf transplantierten Hepatozyten darstellen (Pfeilspitze). Eine verminderte oder verstärkte Expression von ICAM-1 im angrenzenden Empfängerparenchym konnte nicht gezeigt werden (Originalvergrößerung x400).

D: Anfärbung der integrierten Spenderhepatozyten im Empfängerparenchym (Pfeilspitze) im selben Ausschnitt wie Abb. 6C (Originalvergrößerung x 400).

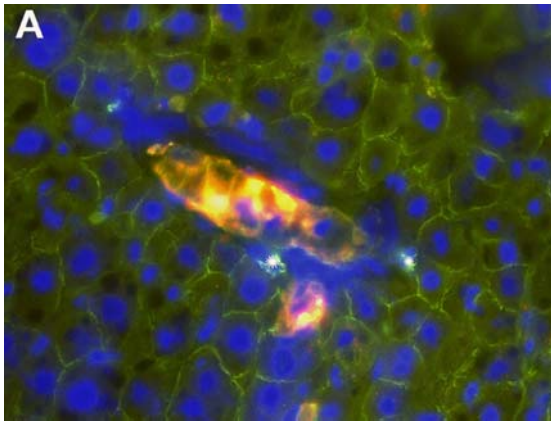
E: 2 Monate nach Transplantation: Nachweis fester ICAM-1 vermittelter Zellkontakte zwischen den in Clustern gewachsenen DPPIV⁺-Spenderhepatozyten und den endogenen Hepatozyten des Empfängerparenchyms (Pfeilspitzen). Die Überlagerung von roter und grüner Fluoreszenz zur Kolokalisation von DPPIV und ICAM-1 ergab einen gelben Farbton (Originalvergrößerung x400).

3.3.2 Analyse der Rolle von E-Cadherin

Im Folgenden wurde E-Cadherin als Zell-Zell-Adhäsion vermittelndes Protein untersucht. Um das Ausmaß der Expression und mögliche Veränderungen während des Integrations- und Repopulationsprozesses zu analysieren, wurde E-Cadherin in Kryoschnitten ebenfalls zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation durch einen immunfluoreszenzgekoppelten Antikörper detektiert und mit Spenderzellen lokalisiert.

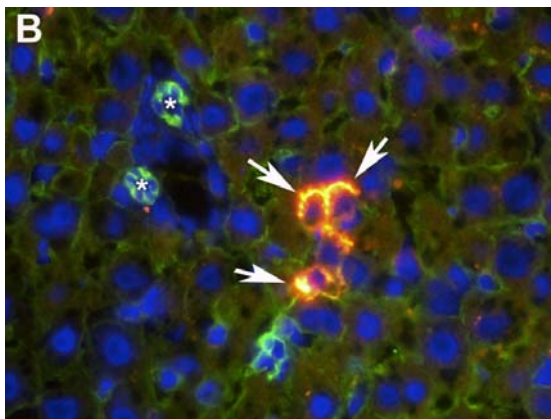
Die Abbildung 13A zeigt (24 Stunden nach Transplantation) E-Cadherin vermittelte Zellkontakte im Empfängerparenchym sowie eine schwache E-Cadherinfärbung auf den Spenderzellen. 3 Tage nach Transplantation ließen sich durch E-Cadherin-Anfärbung feste Zellkontakte integrierter transplantiertes Hepatozyten nachweisen (Abb.13B). Diese Zellkontakte bestanden nicht nur zwischen transplantierten, sondern auch zwischen endogenen und transplantierten Hepatozyten (Abb.13B). Auch 2 Monate nach Transplantation war E-Cadherin kontinuierlich auf der Zellmembran zwischen Spender- und Empfängerhepatozyten als Zeichen der erfolgreichen Integration nachweisbar (Abb.13C). Eine deutliche Veränderung im Expressionsmuster von E-Cadherin im Empfängerparenchym konnte zu keinem Zeitpunkt in den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen gefunden werden (Abb. 13A-C).

Besonders hohe Konzentrationen von E-Cadherin fanden sich auf allen Schnitten in Gallengangsepithelien (Abb.13A-C), da das Gallengangsepithel im Gegensatz zum hepatischem Parenchym festere und dichte Zell-Zell-Adhäsionen benötigt. Diese scheinen im Gallengangsepithel in hohem Maße E-Cadherin vermittelt zu sein.

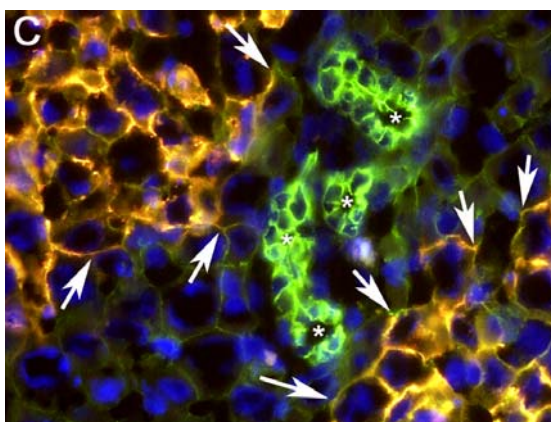
**Abbildung 13**

Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung des anti-E-Cadherin in Grün, anti-CD26 in Rot, Zellkerne mit DAPI in Blau

A: 24h nach Transplantation: Nachweis von E-Cadherin im Empfängerparenchym und besonders in den Gallengängen (weißer Stern). Nicht integrierte Spenderhepatozyten befanden sich noch im Gefäßsystem und exprimierten schwach E-Cadherin (Originalvergrößerung x400).



B: 3 Tage nach Transplantation integrierte Spenderhepatozyten wiesen E-Cadherinverbindungen (Pfeilspitze) mit dem umliegenden Empfängerparenchym auf. Dabei ergab die deutliche Überlagerung der roten und grünen Fluoreszenz eine gelbe Darstellung in der Kollokalisierung (Originalvergrößerung x400).



C: 2 Monate nach Transplantation gelang der kontinuierliche Nachweis von E-Cadherinverbindungen zwischen Spender und Empfängerhepatozyten als Zeichen fester und erfolgreicher Integration (weiße Pfeile). Farbintensive Darstellung der Gallengangsepithelien (weißer Stern) (Originalvergrößerung x400).

3.3.3 Darstellung des leberspezifischen Connexin 32

Neben mechanischen Zell-Zell-Kontakten wurde Connexin 32 als interzelluläres Zellkommunikationsprotein („gap junctions“) untersucht. Da die Kommunikation benachbarter Zellen die Anwesenheit von „gap junctions“ erfordert, sollte überprüft werden, ob eine Veränderung im Expressionsmuster von Connexin 32 Rückschlüsse auf die erfolgreiche Integration und metabolische Kommunikation transplanteder Hepatozyten im Empfängerparenchym geben kann.

Bei der Gewinnung und Isolierung transplanteder Hepatozyten mittels In-situ-Kollagenase-Perfusion wurde ein Großteil der „gap junctions“ zerstört. Ein entsprechend verminderter Nachweis stellte sich im gefärbten Zytospin der isolierten Zellsuspension dar (Abb. 14A). Durch die Transplantation und in der frühen Post-Transplantationsphase mit Überwinden der Endothelzellbarriere kam es zu einer weiteren Reduktion der Oberflächenpräsenz von Connexin 32. 30 min nach Transplantation (Abb. 14B) ließen sich nur geringe Mengen von Connexin 32 in der Zellmembran der Spenderzellen anfärben. Eine allmähliche Reexpression des Proteins erfolgte über einen Zeitraum von drei bis fünf Tagen (Abb. 14C). Danach ließ sich eine homogene Verteilung von Connexin 32 auf der Zellmembran von Spenderzellen als Zeichen der Integration nachweisen (Abb. 14D). In der Immunfluoreszenzfärbung führte die Überlagerung der Grünfluoreszenz (Connexin 32) mit der roten Fluoreszenzdarstellung von DPPIV zum Nachweis eines gelben punktförmigen Signals. Während der Organrepopulation bildeten sich feste interzelluläre Kontakte nicht nur zwischen transplanteden sondern auch zwischen Empfänger- und Spenderhepatozyten aus (Abb. 14E).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die transplanteden Spenderhepatozyten nicht als isolierte Cluster in der Empfängerleber wuchsen, sondern ab dem 3. Tag mit den endogenen Hepatozyten über hybride „gap junctions“ kommunizierten.

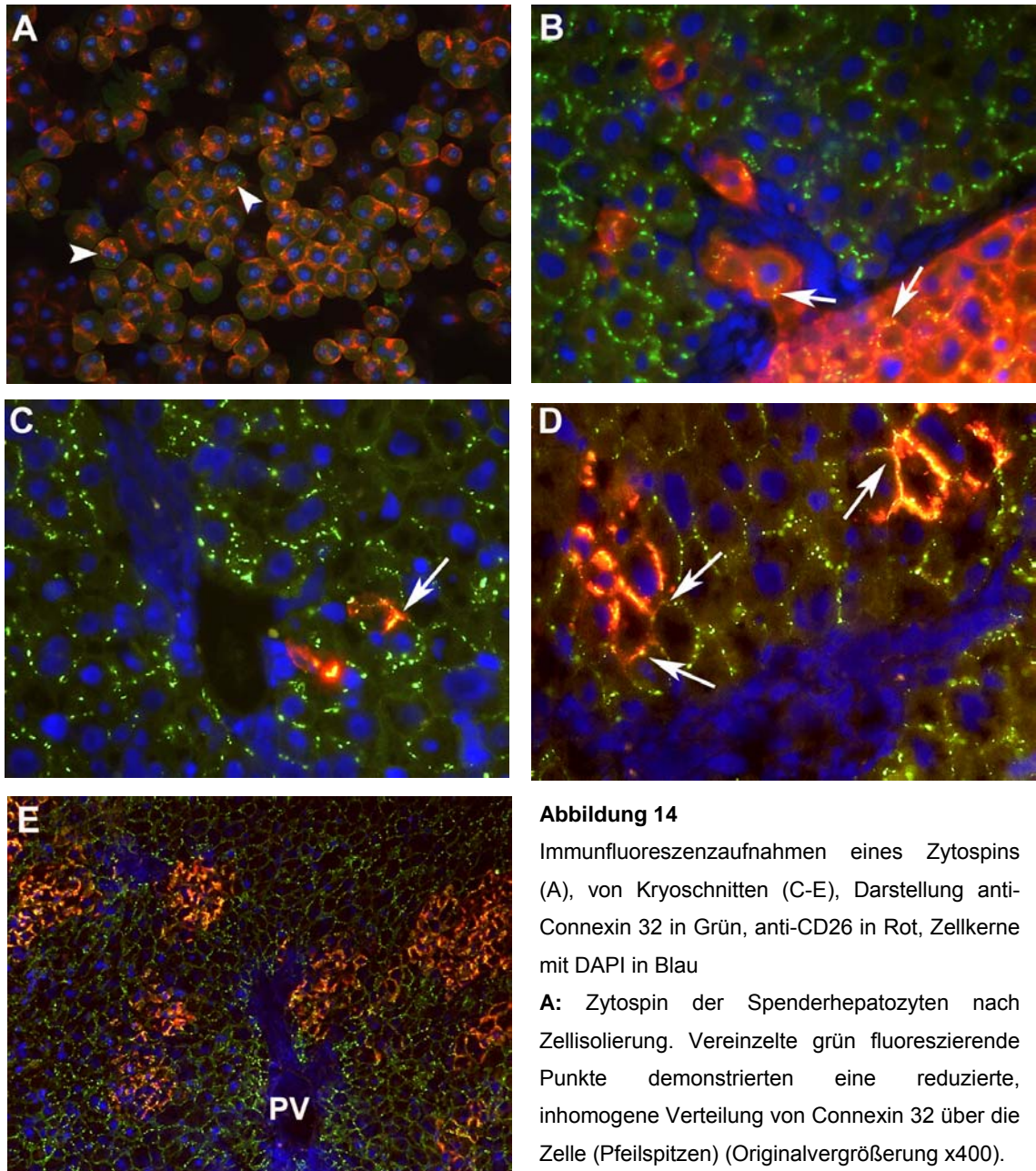


Abbildung 14

Immunfluoreszenzaufnahmen eines Zytospins (A), von Kryoschnitten (C-E), Darstellung anti-Connexin 32 in Grün, anti-CD26 in Rot, Zellkerne mit DAPI in Blau

A: Zytospin der Spenderhepatozyten nach Zellisolierung. Vereinzelt grün fluoreszierende Punkte demonstrieren eine reduzierte, inhomogene Verteilung von Connexin 32 über die Zelle (Pfeilspitzen) (Originalvergrößerung x400).

B: 30 min nach Transplantation: Auf den Spenderhepatozyten waren nur wenige ‚gap junctions‘ erhalten (Pfeile). Im Gegensatz dazu wies das Empfängerparenchym eine höhere und gleichmäßige Expression von Connexin 32 auf (Originalvergrößerung x400).

C: 3 Tage nach Transplantation hatte eine Reexpression von Connexin 32 bei den integrierten transplantierten Hepatozyten stattgefunden (Pfeil). Die Aktivität von DPPIV war zu diesem Zeitpunkt lokalisiert in der basolateralen Zellmembran zu finden (Originalvergrößerung x400).

D: 21 Tage nach Transplantation wiesen die in Clustern angeordneten Spenderzellen und ihre Abkömmlinge vollständig rekonstituierte ‚gap junctions‘ auf (Pfeile) (Originalvergrößerung x400).

E: Die Übersichtsaufnahme 2 Monate nach Transplantation zeigt die homogene Architektur des repopulierten Leberläppchens und die gleichmäßige Verteilung von Connexin-32 auf der Zellmembran der Spenderzellen. Es fanden sich gleichermaßen gap-junction-Verbindungen zwischen transplantierten und Empfängerzellen, sowie innerhalb des Spenderzellclusters. Die Spenderzellcluster wuchsen ohne Zeichen der Raumforderung im Empfängerparenchym (Originalvergrößerung x100).

4 Diskussion

4.1 Hepatozelluläre Transplantation im DPPIV⁻-Fischer-344-Tiermodell

Zur Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der Leberzelltransplantation sind in den vergangenen Jahrzehnten verschiedene Tiermodelle entwickelt worden (vgl. Einleitung, Abs. 1.2). Prinzipiell erfolgt die Darstellung transplanteder Hepatozyten im Empfängerparenchym entweder durch Zellmarkierung mit Farbstoffen bzw. Radioisotopen oder durch den Einsatz mutagener Tiermodelle.

In der vorliegenden Dissertation wurde ein Tiermodell mit Dipeptidylpeptidase IV⁻-Fischer-344-Ratten als Empfängertiere und Wildtyp-Fischer-344-Ratten (DPPIV⁺) als Spendertiere verwendet. Die zugrunde liegende Spontanmutation im Gen der membrangebundenen Exopeptidase DPPIV hat keinen Phänotyp bei den betroffenen Tieren. Da die Tiere von genetisch identischen Inzuchtstämmen abstammen, handelt es sich um eine syngene Transplantation, die keine Immunsuppression erfordert.

Bei der Anwendung dieses Tiermodells gewährleistete die Detektion des Antigens DPPIV durch Histochemie eine einfache und sichere Nachweismethode transplanteder Hepatozyten im Empfängerorgan. Als weitere Methode stand der Nachweis transplanteder Zellen durch einen fluoreszenzgekoppelten Antikörper gegen CD26 zur Verfügung, der als Antigen DPPIV auf der Zellmembran erkennt. Diese Methode wurde insbesondere bei der Kolokalisation von Zellmembranproteinen mit DPPIV⁺-Zellen genutzt. Neben dem Nachweis transplanteder Hepatozyten durch DPPIV konnte durch Analyse des Verteilungsmusters von DPPIV auch eine Aussage zur weiteren Differenzierung der Spenderhepatozyten getroffen werden (vgl. Abs. 4.3).

Eine wesentliche Grundlage für Langzeitversuche (länger als einen Monat) besteht in der konstanten Nachweisbarkeit der Spenderhepatozyten. In alternativen Verfahren wurden transplantede Hepatozyten vor der Transplantation mit exogenen Substanzen, wie z.B. Dil markiert. Diese Marker

unterliegen abbauenden Prozessen, die die Nachweisbarkeit der Zellen über längere Zeiträume einschränken (Markus et al. 1997). Demgegenüber wäre ein Verlust des DPPIV-Spenderantigens im Sinne einer somatischen Mutation nur theoretisch denkbar und ist bisher in allen zugänglichen Publikationen noch nicht beschrieben. Somit eignet sich das DPPIV-Fischer-344-Tiermodell besonders für lange Beobachtungszeiträume.

4.2 Intraportale Transplantation

Als mögliche Implantationsorte für Spenderhepatozyten im Empfängertier werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten beschrieben (Übersicht in Fox und Roy-Chowdhury 2004). In der Mehrzahl der Untersuchungen zur Hepatozytentransplantation wurde bisher die intrasplenale Transplantation der isolierten Zellen angewandt, da die Spenderzellen über das Portalgefäßsystem in die Leber ausgeschwemmt werden (Ponder et al. 1991). Viele Arbeitsgruppen bevorzugen diese Methode aufgrund der geringen postoperativen Komplikationsrate (Gupta 2002). Insbesondere treten nach intrasplener Transplantation kaum Nachblutungen auf.

In der vorliegenden Dissertation wurde die direkte Transplantation der Hepatozyten in die Pfortader favorisiert. Dabei stellt der schnellere Transport der Spenderhepatozyten in die Leberläppchen einen Vorteil gegenüber der intrasplenen Transplantationsroute dar. Die Zeitverzögerung durch die Migration transplantierte Hepatozyten von der Milz zur Leber kann, wie von Spinelli et al. (2002) beschrieben, bis zu 48 h betragen. Außerdem zeigten Gupta et al. (1997), dass nur ein Teil der in die Milz transplantierten Zellen das portale Gefäßbett überhaupt erreicht. Ein deutlicher Zellverlust während der ersten 24 Stunden nach Transplantation wurde ebenso von de Roos et al. (1997) in quantitativen Analysen nachgewiesen. Folglich sind für die ektopye, intrasplenale Transplantation aufgrund der beschriebenen Zellverluste größere Zellzahlen erforderlich. Im Hinblick auf die klinische Anwendung der Hepatozytentransplantation muss bei der geringen Anzahl zur Verfügung stehender Spenderorgane bzw. -zellen auch dieser Aspekt beachtet werden.

Die Transplantation von Hepatozyten in die Milz oder in die Pfortader führt gleichermaßen zur portalen Hypertension (Gupta et al. 1999 b) und konsekutivem Anstieg der Expression von Leberenzymen im Empfängerorgan, wie z.B. der GGT (Gupta et al. 2000). Hyon et al. (2004) bestätigten diese Effekte bei der Injektion von Inselzellen in die Pfortader und zeigten dabei ebenso einen Anstieg der Leberenzyme AST und ALT. Da es sich nur um eine transiente portale Hypertension sowie um einen kurzfristigen Anstieg der Leberenzyme handelt, ist mit keinen nachhaltig negativen Effekten zu rechnen. Das höhere Risiko von Nachblutungen bei der intraportalen Transplantation wurde in der vorliegenden Untersuchung durch die Verwendung einer sehr kleinen Kanüle für die Zellinjektion und die anschließende Abdichtung der Einstichstelle mit einem Hämostyptikum minimiert (vgl. Abs. 2.8.2).

4.3 Integration transplantierte DPPIV⁺-Hepatozyten

Die Integration transplantierte Hepatozyten in das Empfängerparenchym erfordert Wechselwirkungen zwischen Donor- und Empfängerzellen wie interzelluläre Kontakte zum Stoffaustausch und zur Signalweitergabe. Für eine erfolgreiche Integration in das Leberparenchym ist nach Platzierung transplantierte Zellen im portalen Gefäßsystem die Migration durch die Endothelzellschicht notwendig. Anschließend erfolgt im Empfängerparenchym die weitere Integration von Spenderhepatozyten mit Rekonstruktion von ‚gap junctions‘ und Zell-Zell-Adhäsionsstrukturen.

4.3.1 Migrationsort und Migrationszeitpunkt transplantierte Hepatozyten im Empfängerparenchym

Der Nachweis transplantierte Hepatozyten gelang in der vorliegenden Arbeit durch histochemische Färbemethoden sowie Immunfluoreszenz an Kryoschnitten. Dabei wurden bereits 30 min nach Transplantation Spenderzellen in hepatischen Sinusoiden und distalen Ästen der Portalvene lokalisiert. Der Übertritt transplantierte Hepatozyten in das Empfängerparenchym fand hauptsächlich während der ersten 19 Stunden nach

Transplantation statt. Hierbei wurde von unserer Arbeitsgruppe erstmals gezeigt, dass transplantierte Hepatozyten die Endothelzellbarriere nicht nur im Bereich der Sinusoide überwinden, sondern auch direkt aus distalen Ästen der Portalvene migrieren (vgl. Abs. 3.2.4) (Koenig et al. 2005). Bisher hatten Gupta et al. (1999 a) nur eine Disintegration des sinusoidalen Endothels 16 und 20 Stunden nach intrasplenaler Transplantation beschrieben und waren allein von einem Übertritt transplantierte Hepatozyten aus den Sinusoiden in das Parenchym ausgegangen. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen Transplantationstechnik liegen, da Gupta et al. (1999 a) den intrasplenalen Zugang verwendeten. Ausgehend von der Hypothese, dass die intraportale Transplantation von Spenderzellen zu einem größeren portalen Hypertonus führt, wird dabei auch vermehrter mechanischer Stress im portalen Gefäßsystem verursacht. Dadurch könnten auch in Ästen der Portalvene Eintrittspforten für transplantierte Hepatozyten entstehen.

4.3.2 Reaktive Prozesse nach hepatozellulärer Transplantation

Zur Untersuchung des Zustandes der Endothelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Immunfluoreszenzfärbung an Kryoschnitten mit dem Antikörper OX-43 (Endothelzellmarker) durchgeführt. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine deutliche Disintegration der Endothelzellbarriere 19 Stunden nach Transplantation sichtbar. Eine geschädigte Endothelzellschicht fand sich in den Sinusoiden ebenso wie in distalen Ästen der Portalvene. Zu einem späteren Zeitpunkt, 21 Tage nach Transplantation, stellte sich die Endothelzellschicht wieder vollständig unversehrt dar (vgl. Abs. 3.2.4).

Diese Daten decken sich mit elektronenmikroskopischen Bildern von Gupta et al. (1999 c), die ‚Zerreißen‘ im Endothel in unmittelbarer Nachbarschaft zu transplantierten Hepatozyten beobachteten. Auch in Ischämie / Reperfusion-Studien der Rattenleber von Huet et al. (2004) fand sich eine Disintegration der sinusoidalen endothelialen Membranbarriere und ein Absterben sinusoidaler Endothelzellen.

Zu den Ursachen der beschriebenen Unterbrechungen im Endothel tragen wahrscheinlich mehrere Faktoren bei:

Kurz nach der Injektion werden transplantierte Hepatozyten über das Pfortaderstromgebiet transportiert und verschließen distal kleinere Pfortaderäste und Sinusoide. In Folge der Mikroembolisation durch das Zusammenlagern von Spenderhepatozyten zu Zellagglomeraten entwickelt sich ein portaler Hochdruck, der sich innerhalb weniger Stunden wieder normalisiert. Bereits einen Tag nach Transplantation konnten Gupta et al. (1999 a) im portalen Venogramm keine Zeichen einer Hypertension mehr nachweisen. Dennoch führen die frühen mikrozirkulatorischen Perfusionsstörungen zu ischämischen Folgeprozessen im angrenzenden hepatischen Gewebe, die auf der folgenden Seite in Abb. 15 illustriert werden (Gupta et al. 1999 c).

Diese Ischämie mit nachfolgender Reperfusion führt zur Auslösung einer akuten, nicht-infektiösen Entzündungsreaktion durch die Ausschüttung verschiedener proinflammatorischer Zytokine aus den endogenen Hepatozyten, Kupferzellen sowie Endothelzellen, ähnlich einer Akut-Phase-Reaktion (Joseph et al. 2002). Bisher sind eine Vielzahl von Zytokinen in diesem Prozess beschrieben (unter anderem TNF- α , die Interleukine IL1, IL12, IL18 sowie INF γ und VEGF), die einerseits die postischämische Entzündung durch Aktivierung von Entzündungszellen und Endothelzellen triggern und andererseits auch direkt in Hepatozyten und Endothelzellen Apoptose induzieren (Gupta und Joseph 2002). Die genaue Interaktion der einzelnen Zytokine bei Ischämie und Perfusionsphänomen ist Gegenstand derzeitiger Forschung (Arii et al. 2003, Takeuchi et al. 2004).

Ein Beispiel für die parakrine Interaktion zwischen transplantierten Hepatozyten und Endothelzellen stellt der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) dar, der aus endogenen und transplantierten Hepatozyten durch die passagere Ischämie freigesetzt wird (Gupta et al. 1999 c). Da auch in der Leber Endothelzellen VEGF-Rezeptoren tragen, führt die Bindung von VEGF zu einer Permeabilisierung des Endothels (Funyu et al. 2001). Schon bei Erstbeschreibung von VEGF aus Tumorisolaten durch Senger et al. (1983) wurde für VEGF neben einer Steigerung der Permeabilität auch eine Neovaskularisierung postuliert.

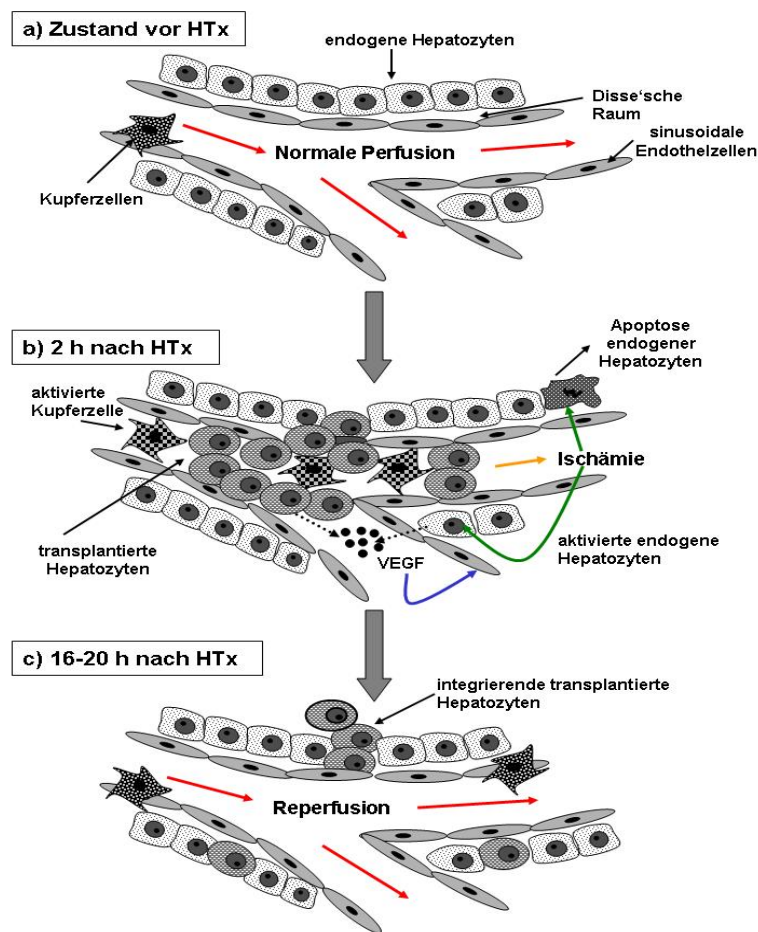


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Integrationsprozesse transplanteder Hepatozyten
 modifiziert nach Gupta et al. (1999 c)

a) Veranschaulichung der normalen Perfusion (roter Pfeil) der Leber in den durch Endothel begrenzten Sinusoiden, wobei der Disse'sche Raum Hepatozyten von Endothelzellen trennt. Die Kupferzellen (Lebermakrophagen) liegen innerhalb der blutgefüllten Sinusoide und ragen mit ihren Fortsätzen in den Disse'schen Raum.

b) 2 h nach HTx befinden sich in den Sinusoiden Mikroembolien aus transplantierten Hepatozyten, die eine postembolische Ischämie bedingen (orange Pfeil). In Folge der Ischämie begehen einige endogene Hepatozyten Apoptose und es werden Kupferzellen zur Säuberung der Sinusoide aktiviert. Ferner wird durch die Ischämie in den Kupferzellen die Superoxid-Radikal Produktion induziert, welche zur Schädigung der Endothelzellen beiträgt. Postischämisch produzieren endogene, aktivierte (grüner Pfeil) sowie transplantierte Hepatozyten VEGF, welches in die Sinusoide ausgeschüttet wird und parakrin auf die Permeabilisierung des Endothels einwirkt (blauer Pfeil). Reaktiv wird transplantierten Hepatozyten der Eintritt in das Leberparenchym erleichtert.

c) 16-20 h nach HTx ist der Übertritt transplanteder Hepatozyten aus den Sinusoiden in das Leberparenchym vollzogen. Die Sinusoide werden reperfundiert und die Kupferzellen befinden sich wieder im inaktivierten Zustand angelagert an die Endothelzellen. Transplantierte Hepatozyten befinden sich im Prozess der vollständigen Integration in das Empfängergewebe. Anschließend treten die integrierten Zellen in die Proliferationsphase über.

Auch die Arbeitsgruppe von Assy et al. (1999) zeigte, dass durch Freisetzung von VEGF die Perfusion durch vermehrte ‚Neovascularisation‘ der Leber gefördert wird. Als Folge des verbesserten Nährstoffangebotes tritt eine vermehrte Hepatozytenregeneration auf und trägt so zu einer beschleunigten Leberregeneration bei.

Als weiterer, nicht-entzündlicher Faktor für die Entstehung der Disintegration des Endothels werden während der temporären Ischämie aus Kupferzellen Superoxid-Radikale freigesetzt, die direkt toxisch auf die Endothelzellen wirken (Gupta et al. 1999 c) (vgl. Abb. 15).

Ferner werden durch die Zusammenlagerung von Spenderhepatozyten im portalen Gefäßsystem vermutlich auch Scherkräfte hervorgerufen, die wiederum durch mechanische Kräfte Schäden an der Endothelzellbarriere verursachen können. Einfluss auf die Größe der entstehenden Scherkräfte hat vermutlich auch die Anzahl transplantierte Hepatozyten.

In weiteren Studien könnte dementsprechend untersucht werden, ob durch Transplantation kleinerer Zellzahlen geringere vaskuläre Turbulenzen hervorgerufen und geringere Scherkräfte am Endothel wirksam werden. Infolge dessen wäre bei Transplantation einer geringeren Anzahl von Spenderhepatozyten deren erfolgreiche Integration entsprechend reduziert. Ob es sich hierbei um eine proportionale Beziehung handelt, ist bisher nicht bekannt.

Ein ebenfalls häufig diskutierter putativer Eintrittsort für Spenderhepatozyten in das Empfängerparenchym stellen die physiologischen Endothellücken des sinusoidalen Endothels dar. Diese sogenannten ‚fenestrae‘ erreichen eine Größe bis zu 175 nm (Wack et al. 2001), so dass ein Durchtritt von Spenderhepatozyten mit einer Größe von 20-25 μm durch die ‚fenestrae‘ aufgrund des Größenunterschiedes unwahrscheinlich ist (Rajvanshi et al. 1996). Zudem besitzen die Hepatozyten keine Lamellopodien zur aktiven Fortbewegung. Da in der vorliegenden Arbeit zu keinem Zeitpunkt Deformierungen von Spenderhepatozyten im Empfängerparenchym beobachtet wurden, ergeben sich ebenfalls keine Hinweise auf einen Durchtritt durch die ‚fenestrae‘. Dieses Ergebnis stimmt überein mit Untersuchungen der

Arbeitsgruppe von Gupta et al. (1999 a), die in elektronenmikroskopischen Untersuchungen des Empfängerparenchyms ebenfalls keinen Anhalt für den Eintritt von Spenderhepatozyten durch ‚fenestrae‘ in das Leberparenchym fand. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass für eine erfolgreiche Integration transplanteder DPPIV⁺-Hepatozyten in das Empfängerparenchym das Überwinden der Endothelzellbarriere die wesentliche Voraussetzung ist und in einem kritischen Zeitintervall von frühestens 30 min bis zu 24 Stunden erfolgt.

4.3.3 Verbesserung der Integration transplanteder Hepatozyten im DPPIV-Ratten-Modell durch exogen zugeführte Pharmaka

Zur Verbesserung der Integration versuchten Malhi et al. (2002) den Migrationsprozess der Spenderhepatozyten durch die Endothelzellbarriere zu beeinflussen. Der Arbeitsgruppe gelang es hierbei eine direkte Zerstörung des hepatischen sinusoidalen Endothels durch die Verabreichung des Alkylans Cyclophosphamid hervorzurufen und den Eintritt transplanteder Hepatozyten in das Parenchym zu beschleunigen. Anschließend erfolgte ebenfalls in Cyclophosphamid behandelten Tieren eine signifikant schnellere Repopulation der Leber. Aufgrund der benötigten toxischen Dosis ist allerdings derzeit die klinische Anwendung von Cyclophosphamid für die humane Hepatozytentransplantation nicht zu erwägen.

Einen anderen Lösungsansatz zur Erleichterung der Integration verfolgte die Arbeitsgruppe von Bhargava et al. (2000), die die Wirkung verschiedener vasodilatatorischer Substanzen auf den Gefäßtonus der hepatischen Sinusoide untersuchte. Eine Transplantation sollte je erfolgreicher sein, desto mehr Zellen in den Sinusoiden und distalen Abschnitten des portalen Gefäßsystems positioniert werden können. Die Erweiterung der hepatischen Sinusoide nach Gabe von Nitroglycerin und Phentolamin führte bei der Transplantation zu einer konsekutiven Umverteilung der Spenderhepatozyten in die distalen Gefäßabschnitte und steigerte dadurch den Anteil erfolgreich integrierter Hepatozyten in das Empfängerparenchym (Slehra et al. 2002).

Ob eine systemische Applikation von VEGF zu einer Verbesserung der hepatozellulären Transplantation beiträgt ist Gegenstand der Forschung und wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe untersucht.

4.3.4 Sequestration nicht integrierter Spenderhepatozyten

In der vorliegenden Dissertation wurde gezeigt, dass transplantierte Hepatozyten hauptsächlich während der ersten 24 Stunden nach Transplantation in das Empfängerparenchym migrierten. Nicht integrierte Spenderhepatozyten verblieben im portalen Gefäßsystem und waren aber dort bis zu 3 Tage nach der Transplantation nachweisbar.

Vermutlich tragen verschiedene Faktoren dazu bei, dass nicht alle Spenderhepatozyten in das Empfängerparenchym integriert werden. Die kurz nach der Transplantation gebildeten Zellemboli aus Spenderhepatozyten verursachen möglicherweise einerseits einen direkten Untergang der transplantierten Zellen. Andererseits rufen diese Zellkonglomerate eine Perfusionsstörung im angrenzenden Parenchym hervor und führen über die oben bereits beschriebene Aktivierung von Entzündungszellen zur Ausschüttung von Mediatoren. Diese induzieren vermehrt Apoptose im angrenzenden Leberparenchym und unter den Spenderhepatozyten (Gupta et al. 2000).

In histochemischen Färbungen 24 Stunden nach Transplantation wurde die Anlagerung von Entzündungsinfiltraten um Portalgefäße mit eingeschlossenen Spenderhepatozyten beobachtet. Unter anderem handelt es sich bei diesen Entzündungszellen um aktivierte Kupfferzellen, die ortsansässige hepatische Makrophagen darstellen. Nachgewiesen wurde die Aktivierung von Kupfferzellen durch Ischämie bereits in verschiedenen hepatischen Ischämie/Reperfusionstudien (Serracino-Inglott et al. 2001). Aktivierte Kupfferzellen sind neben nicht-residenten Makrophagen vermutlich hauptsächlich am Abtransport nicht-integrierter Spenderhepatozyten beteiligt. Diese Hypothese wird durch Untersuchungen von Joseph et al. (2002) unterstützt, in denen durch direkte Behinderung der Kupfferzellfunktion eine höhere Überlebensrate bei transplantierten Hepatozyten erzielt wurde.

4.3.5 Zelladhäsion und Zellkommunikation

In der vorliegenden Studie wurden zur Beurteilung der Zelladhäsion von Spenderhepatozyten in das Empfängerparenchym E-Cadherin und ICAM-1 sowie zur Bewertung der interzellulären Kommunikation Connexin 32 an Kryoschnitten mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Veränderungen im Expressionsmuster dieser Proteine auf Spender- und Empfängerhepatozyten sollten Rückschlüsse auf die Integration transplantierte Hepatozyten in das Leberparenchym geben.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits nachgewiesen, dass die Quantität an exprimiertem Connexin 32 unter pathologischen Zuständen in der Leber variiert. Eine Verminderung der Expression dieses Proteins wurde in hepatischen Ischämie- und Reperfusionstudien (Gingalewski und De Maio 1997) sowie bei viraler Hepatitis und Leberzirrhose (Yamaoka et al. 2000) beobachtet.

Während des Zellisoliationsprozesses werden durch enzymatische und mechanische Dissoziation eine Zerstörung der Gewebeintegrität und ein damit verbundener Verlust von ‚gap junctions‘ auf Spenderhepatozyten hervorgerufen. Aus diesem Grund konnte Connexin 32 nur vereinzelt auf isolierten Zellen nachgewiesen werden. Während der nachfolgenden Passage durch die Endothelzellbarriere wird die Zelloberfläche der Spenderhepatozyten wahrscheinlich durch Scherkräfte weiter beeinträchtigt. Übereinstimmend hierzu kam eine verminderte Expression von Connexin 32 auf Spenderhepatozyten kurz nach Transplantation (30 min) zur Darstellung. Ein vollständiger Verlust von Connexin 32 auf den Spenderhepatozyten wurde jedoch zu keinem der Zeitpunkte beobachtet. Im Gegensatz hierzu stehen Untersuchungsergebnisse von Gupta et al. (1999 a), die bis 48 h nach Transplantation einen vollständigen Verlust der ‚gap junctions‘ nachweisen. Die Reexpression von Connexin 32 wurde in der vorliegenden Arbeit im Zeitraum von 3-5 Tagen nach Transplantation beobachtet. Gupta et al. (1999 a) hingegen beschreiben vollständig gebildete ‚gap junctions‘ erst 7 Tage nach Transplantation.

Im Empfängerparenchym konnte andererseits mittels Immunfluoreszenztechnik keine Veränderung der Expression von ‚gap junctions‘ auf endogenen

Hepatozyten nachgewiesen werden. Es ist dennoch nicht sicher auszuschließen, dass eine temporäre Unterbrechung der ‚gap junctions‘ stattfindet. Gupta et al. (1999 a) hatten mithilfe eines anderen Antikörpers einen partiellen Verlust von Connexin 32 auf endogenen Hepatozyten beschrieben. Dieses Phänomen wurde von der genannten Arbeitsgruppe in enger Nachbarschaft zu Empfängerhepatozyten im Zeitraum von 2 und 24 Stunden beobachtet. Gründe für die abweichenden Ergebnisse könnten in der Verwendung unterschiedlicher Antikörper liegen, da die Darstellung der Antikörperfärbung sehr abhängig vom immunisierten Antigen ist. Insofern wären zur Klärung des Sachverhaltes weiterführende Untersuchungen notwendig (z.B. quantitative RT-PCR)

In der Untersuchung zur Expression von ICAM-1 wurde zu keinem Zeitpunkt nach Transplantation eine quantitative Veränderung im Ausmaß der Expression auf hepatischen Endothelzellen sowie endogenen Hepatozyten beobachtet. Zelladhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, sind in der Leber von besonderer Bedeutung für die Leukozytenadhäsion am Endothel und werden dementsprechend reaktiv unter Entzündungszuständen vermehrt gebildet (Jaeschke 1997). Da fluoreszenzmikroskopisch keine Veränderungen in der Expression von ICAM-1 beobachtet wurden, ist davon auszugehen, dass Spenderhepatozyten während der Migration in das Empfängerparenchym wahrscheinlich nicht auf Ankermechanismen zurückgreifen. Für die Migration von Leukozyten in entzündetes Gewebe sind im Gegensatz hierzu diese Ankermechanismen erforderlich.

Bei Ischämie-/Reperfusionsvorgängen werden in der Literatur mehrheitlich Veränderungen in der Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, in der Leber beschrieben (Jaeschke 2003). In der vorliegenden Untersuchung wird eine durch die Hepatozytentransplantation ausgelöste Ischämie mit anschließender Reperfusion angenommen, in deren Folge aber keine Veränderungen im Expressionsmuster von Zelladhäsionsmolekülen beobachtet wurden. Ähnliche Ergebnisse erzielte die Arbeitsgruppe von Benkoel et al. (2003), die zeigte, dass die Expression von ICAM-1 nicht mit Ischämie-Reperfusionverletzungen der Leber korreliert. Als Erklärung für die

fortwährende Expression von ICAM-1 könnte der durch die Ischämie ausgelöste Anstieg von Entzündungsmediatoren fungieren.

Ferner wurde mittels Immunfluoreszenztechnik E-Cadherin untersucht, das die interzelluläre Adhäsion vermittelt. Aus Studien zur Tumorinvasion und zu ihrem Metastasierungsverhalten ist bekannt, dass die Anzahl exprimierter Cadherine während der Metastasierung abnimmt (Ray et al. 1999). Foty und Steinberg (2004) zeigten, dass eine gesteigerte Expression der Cadherine das Wachstum maligner Zellreihen inhibieren kann. Demzufolge lag der vorliegenden Untersuchung die These zugrunde, dass die Invasion von Spenderhepatozyten in das Empfängerparenchym vermutlich zu einer veränderten Expression des E-Cadherins führen könnte. Mittels Immunfluoreszenz ließ sich diese Vermutung nicht bestätigen. Demgegenüber demonstrierten die Ergebnisse der vorliegenden Studie eine stabile und gleichmäßige Expression des untersuchten Cadherins an der Zellmembran zwischen Spender- und Empfängerhepatozyten zu allen Untersuchungszeitpunkten. Es konnten feste Zellkontakte zwischen Spender- und Empfängerhepatozyten sowohl zu frühen Zeitpunkten (3 Tage) als auch zu späten Zeitpunkten (2 Monate) nach Transplantation dokumentiert werden. In der E-Cadherinfärbung kommen ebenfalls Gallengänge zur Darstellung, da E-Cadherin als epithelialer Zellmarker auch das Epithel der Gallengänge markiert. Bei der histologisch dargestellten Kolo-kalisation von Spenderhepatozyten und E-Cadherin wurden Gallenkanälchen in enger Nachbarschaft zwischen erfolgreich integrierten Spenderhepatozyten und Empfängerhepatozyten gezeigt, so dass zu vermuten ist, dass sich beide Zellpopulationen den Gallenabfluss teilen.

Weiterhin kann die halbmondförmige Anordnung der DPPIV-Färbung auf der basolateralen Membran der Spenderhepatozyten als zusätzliches indirektes Zeichen für eine erfolgreiche Integration interpretiert werden. Dieses Färbemuster war erst 3 Tage nach Transplantation sichtbar, während die DPPIV-Färbung vorher diffus über die Zelloberfläche verteilt war. Begründet ist diese Veränderung im Färbemuster mit der Aufnahme der metabolischen Aktivität der Spenderhepatozyten.

4.4 Repopulation der Leber

Das Repopulationsausmaß nach heptozellulärer Transplantation in einer ungeschädigten Rattenleber beträgt 1-3% (Gupta 2002). Wiederholte Zelltransplantationen können den Repopulationserfolg auf ca. 5-7% verbessern (Rajvanshi et al. 1996). Um die Effizienz der Repopulation zu verbessern, muss allerdings den Spenderhepatozyten ein Überlebensvorteil gegenüber endogenen Hepatozyten gewährt werden. Dies kann durch Blockierung des Zellzyklus der endogenen Hepatozyten mittels Retrorsin erreicht werden, das den Empfängertieren vor Transplantation appliziert wird (Laconi et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurde diese Methode angewandt, um eine selektive Proliferation der Spenderhepatozyten zu erzielen. Zusätzlich wurden Regenerationsbedingungen durch eine partielle Hepatektomie von 30% geschaffen (Koenig et al. 2005). Sigal et al. (1999) hatten in diesem Zusammenhang gezeigt, dass durch eine Leberteilektomie vor Transplantation die Proliferation von transplantierten Hepatozyten angeregt wird. Ein stimulierender Effekt der Repopulation wird nach Malhi et al. (2002) auch durch Ischämie und Reperfusion ausgelöst. Alternativ zu Retrorsin kann exogene Bestrahlung Schäden an der DNA endogener Hepatozyten verursachen und damit die Leberzellteilung inhibieren. Hierbei wurde in einer Studie die Kombination aus Radiatio und Leberteilektomie angewandt (Guha et al. 2002). In der vorliegenden Studie wurde aufgrund der einfachen Applikation und der geringen systemischen Nebenwirkungen, der potentiell karzinogenen Substanz, die Anwendung von Retrorsin bevorzugt. Laconi et al. (1998) hatten gezeigt, dass es auch bis zu 2 Jahre nach Transplantation keinen Anhalt für eine Beeinträchtigung der Leberfunktion oder die Neubildung von Neoplasien nach Retrorsinapplikation gab, ebenso gab es keine Anzeichen für eine toxische Beeinträchtigung anderer Organe.

In der vorliegenden Studie wurden zur Untersuchung der Repopulation histochemische Färbungen der Empfängerleber nach Transplantation angefertigt. Die Anzahl DPPIV⁺-Zellen wurde nach Färbung repräsentativer Schnitte durch Auszählung bestimmt. Dabei war nach Transplantation die Integration einzelner Zellen bereits nach 5 Tagen mit kleinen Ansammlungen

von bis zu 3 Spenderhepatozyten sichtbar. Dies zeigt, dass die Proliferation der Spenderhepatozyten bereits zu diesem Zeitpunkt begonnen hat. Nach 10 Tagen war die Anzahl DPPIV⁺-Hepatozyten in Zellclustern auf bis zu 20 Hepatozyten angestiegen. Diese Ergebnisse weisen auf eine schnelle Repopulation der Empfängerleber hin. Ein verdrängendes Wachstum durch repopulierende Spenderhepatozyten konnte zu keinem Zeitpunkt beobachtet werden. Die Leberläppchenarchitektur des Empfängerparenchyms blieb während des gesamten Repopulationsprozesses vollständig erhalten.

In der Leber sind alle erforderlichen hepatotropen Faktoren für Wachstum und Differenzierung stimulierbar. Das Organ selbst stellt somit das ideale Mikromilieu für transplantierte Hepatozyten dar. Nach Leberteilresektion kommt es zur Ausschüttung von Wachstumshormonen, wie TGF α (Transforming Growth Factor α) sowie HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Michalopoulos 1998), die die Regeneration der Leber fördern (Fausto 2000). Pennisi et al. (2004) zeigten im Umkehrschluss, dass die Regenerationskapazität nach Leberteilresektion in Mäusen, denen Wachstumshormone wie z.B. IGF-1 fehlen, stark vermindert ist. Gupta et al. (1999 d) versuchten durch separate Infusion von HGF nach hepatozellulärer Transplantation die Integration und Proliferation von Spenderhepatozyten zu unterstützen. Die Arbeitsgruppe musste allerdings feststellen, dass sich durch HGF-Infusion die Anzahl integrierter Spenderhepatozyten nicht erhöhen ließ. Somit scheint die Repopulation der Leber multifaktoriell bedingt zu sein.

Zwei Monate nach Transplantation, zum Endzeitpunkt des Beobachtungszeitraums der vorliegenden Arbeit, hatten die Cluster eine Größe von ca. 200 DPPIV⁺-Hepatozyten erreicht. Dieses Ergebnis zeigt erstmals, dass bereits eine 30%ige Resektion der Leber einen ausreichenden Proliferationsstimulus darstellt, während bisher in der Literatur die 2/3 Resektion bevorzugt wurde (Sigal et al. 1999).

Zur exakten quantitativen Bestimmung der Repopulation der Leber erfolgte eine FACS-Analyse an Zellsuspensionen, die aus transplantierte Leber gewonnen wurden. Durch Etablierung dieses FACS-Protokolls bestand hierbei erstmals die Möglichkeit zur genauen Quantifizierung der Langzeitrepopulation, während

in der Vergangenheit das Repopulationsausmaß mit morphometrischen Analysen abgeschätzt werden musste. Die quantitative Auswertung der FACS-Analyse ergab dabei einen Repopulationsanteil der Spenderhepatozyten von 37% der Hepatozytenmasse zwei Monate nach Transplantation. Dies bedeutete, dass mindestens die ursprünglich resezierte Lebermasse von ca. 30% durch Spenderzellen und ihre Abkömmlinge ersetzt wurde. Weiterhin zeigte die FACS-Analyse, dass es keine wesentlichen Unterschiede in der Zellgröße zwischen Spenderhepatozyten und endogenen Hepatozyten gab.

4.5 Ausblick

Die Transplantation adulter Hepatozyten ist eine viel versprechende Alternative zur orthotopen Lebertransplantation. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass adulte Hepatozyten die Leber vollständig repopulieren und dabei genetische Defekte der Leber korrigieren (Laconi et al. 1998, Mignon et al. 1998, Overturf et al. 1998). Mit dem hier vorgestellten Tiermodell wurde eine Methode zur exakten Quantifizierung der Repopulation entwickelt. Außerdem bot es gute Möglichkeiten zur Untersuchung der Interaktion und Integration transplantierte Hepatozyten im Empfängerparenchym. Zur weiteren Analyse der metabolischen Eigenschaften (Kultur, Stoffwechsel, Zellzyklusanalyse, etc.) nach Transplantation in vivo vermehrter Hepatozyten wäre deren Aufreinigung mittels eines FACS-Sorters erforderlich. Es könnte beispielsweise überprüft werden, ob bereits einmal transplantierte Hepatozyten erneut für eine sequentielle Transplantation zur Verfügung ständen und damit ein quasi „unerschöpfliches“ Proliferationspotential zeigen. Dieser Aspekt wäre insbesondere vor dem Hintergrund interessant, dass die Hepatozytentransplantation heute noch durch die geringe Verfügbarkeit von Spenderzellen limitiert ist. Um in Zukunft ausreichende Mengen an adulten Hepatozyten zu bevorraten, müssten geeignete stabile ex vivo Kultursysteme gefunden werden. Im Hinblick auf die klinische Anwendung der adulten Hepatozytentransplantation müssten für die erfolgreiche Transplantation am Patienten ähnlich gute, konditionierende Bedingungen in der Empfängerleber

geschaffen werden, wie dies bereits im Tiermodell unter Zuhilfenahme stimulierender Substanzen gezeigt wurde.

Weiterhin gibt es in der Literatur zunehmend Hinweise, dass die Regeneration der geschädigten Leber nicht nur über adulte Hepatozyten erfolgt. Bei schwerer Leberschädigung unterstützen intrahepatische Stammzellen, sog. Ovalzellen, und ebenso auch extrahepatische Stammzellen aus dem Knochenmark die Regeneration der Leber (Roskams et al. 2003, Yamazaki et al. 2003). Inwieweit die Stammzellpopulationen untereinander interagieren und inwiefern ihr außerordentliches Wachstumspotential möglicherweise für die Zelltransplantation nutzbar gemacht werden könnte, bleibt Gegenstand zukünftiger Studien zur Erforschung der Regenerationskapazität der Leber.

5 Zusammenfassung

Bei der Therapie des akuten und chronischen Leberversagens stellt die Hepatozytentransplantation eine Alternative zur orthotopen Lebertransplantation dar. In der vorliegenden Arbeit wurden die Integrationsmechanismen und die Repopulationskapazität von Spenderzellen im DPPIV⁻-Fischer-344-Rattenmodell untersucht: DPPIV⁺-Spenderhepatozyten wurden durch In-situ-Kollagenase-Perfusion isoliert und anschließend nach 30%iger Leberteileresektion über die Portalvene in DPPIV⁻-Empfängerratten transplantiert. Im Empfängertier war der Zellzyklus der Hepatozyten mit Retrorsin blockiert, so dass eine Repopulation der Leber hauptsächlich durch transplantierte Hepatozyten erfolgen konnte.

Die Integration der Spenderzellen wurde durch Kolo-kalisation von DPPIV⁺-Hepatozyten mit Zellmembranproteinen, wie Connexin 32, ICAM-1 sowie E-Cadherin und OX-43 mittels Doppelimmunfluoreszenz untersucht: Dabei wurden transplantierte Hepatozyten bereits 30 min nach Transplantation in distalen Ästen der Portalvene nachgewiesen. Erstmals konnte gezeigt werden, dass transplantierte Hepatozyten die Endothelzellbarriere nicht nur in den Sinusoiden, sondern auch direkt aus den distalen Ästen der Portalvene überwinden. Infolge der Zellpräparation zeigten die Spenderzellen nach Transplantation eine verminderte Expression von ‚gap junctions‘ (Connexin 32). Die vollständige Rekonstitution dieser ‚gap junctions‘ erforderte 3 bis 5 Tage und war zusammen mit der typischen Expression von DPPIV auf der basolateralen Membran der Spenderhepatozyten 3 Tage nach Transplantation ein Zeichen für die erfolgreiche, metabolische Integration in das Empfängerparenchym.

Als Ausdruck der Integration in den Parenchymverband waren die Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und ICAM-1 3 Tage nach Transplantation auf den Spenderhepatozyten deutlich exprimiert. Eine Veränderung des Expressionsmusters konnte in Langzeitstudien bis zu zwei Monate zu keinem Zeitpunkt gezeigt werden.

Mittels FACS-Analyse konnte zwei Monate nach der Transplantation eine Repopulation der Empfängerleber mit 37% Spenderhepatozyten nachgewiesen werden.

Die hohe Repopulationsrate des Empfängerorgans sowie die gezeigte funktionelle Integration in das geschädigte Empfängerparenchym stellt eine vielversprechende Basis für die klinische Applikation der Hepatozytentransplantation als Alternative zur orthotopen Lebertransplantation dar.

6 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: The Cell. 4th edition, Garland Science Taylor&Francis Group, New York, 2002.

Allen KJ, Soriano HE (2001): Liver cell transplantation: The road to clinical application. J Lab Clin Med 138, 298-312

Arii S, Teramoto K, Kawamura T (2003): Current progress in the understanding of and therapeutic strategies for ischemia and reperfusion injury of the liver. J Hepatobiliary Pancreat Surg 10, 198-194

Assy N, Spira G, Paizi M, Shenkar L, Kraizer Y, Cohen T, Neufeld G, Dabbah B, Enat R, Baruch Y (1999): Effect of vascular endothelial growth factor on hepatic regenerative activity following partial hepatectomy in rats. J Hepatol 30, 911-915

Benkoel L, Doderer F, Hardwigsen J, Benoliel AM, Bongrand P, Botta-Fridlund D, Le Treut YP, Chamlian A, Lombardo D (2003): Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) during ischemia-reperfusion in human liver tissue allograft: image analysis by confocal laser scanning microscopy. Dig Dis Sci 48(11), 2167-72

Bhargava KK, Palestro CJ, Camaya MV, Rajvanshi P, Gupta S (2000): Radionuclide analysis of druginduced blood pool changes in liver and other organs. J Nucl Med 41, 474-479

Bourne JA: Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden. DAKO Corporation, Carpinteria, USA, (2000) S.11-14

Chen L, Davis GJ, Crabb DW, Lumeng L (1994): Intrasplenic transplantation of isolated periportal and perivenous hepatocytes as a long term system for study of liver specific gene expression. *Hepatology* 19, 989-998

Cho JJ, Joseph B, Sappal BS, Giri RK, Wang R, Ludlow JW, Furth ME, Susick R, Gupta S (2004): Analysis of the functional integrity of cryopreserved human liver cells including xenografting in immunodeficient mice to address suitability for clinical applications. *Liver Int* 24, 361-370

Dang NH, Morimoto C (2002): CD26: an expanding role in immune regulation and cancer. *Histol Histopathol* 17, 1213-23

De Roos WK, von Geusau BA, Bouwman E, van Dierendonck JH, Borel Rinkes IH, Terpstra OT (1997): Monitoring engraftment of transplanted hepatocytes in recipient liver with 5-bromo-2'-deoxyuridine. *Transplantation* 63, 513-518

Fausto N (2000): Liver regeneration. *J Hepatol* 32, 19-31

Foty RA, Steinberg MS (2004): Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Biol* 48, 397-409

Fox IJ, Roy-Chowdhury J (2004): Hepatocyte transplantation. *Hepatology* 40, 878-886

Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC (1998): Treatment of the Crigler Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 338, 1422-1426

Funyu J, Mochida S, Inao M, Matsui A, Fujiwara K (2001): VEGF can act as vascular permeability factor in the hepatic sinusoids through upregulation of porosity of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 19 (280), 481-485

Gingalewski C, De Maio A (1997): Differential decrease in connexin 32 expression in ischemic and nonischemic regions of rat liver during ischemia / reperfusion. *J Cell Physiol* 171, 20-27

Grompe M (2001): Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis* 24, 231-244

Grompe M, Laconi E, Shafritz D (1999): Principles of Therapeutic Liver Repopulation. *Semin Liver Dis* 19, 7-17

Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, Lupien PF, Wilson JM (1994): Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia. *Nat Genet* 6, 335-341

Guha C, Sharma A, Gupta S, Alfieri A, Gorla GR, Gagandeep S, Sokhi R, Roy-Chowdhury N, Tanaka KE, Vikram B, Roy-Chowdhury J (1999): Amelioration of radiation-induced liver damage in partially hepatectomized rats by hepatocyte transplantation. *Cancer Res* 59, 5871-5874

Gupta S (2002): Hepatocyte transplantation. *J Gastroenterol Hepatol* 17, 287-293

Gupta S, Rogler CE (1999): Liver repopulation systems and study of pathophysiological mechanisms in animals. *Am J Physiol* 277, 1097-1102

Gupta S, Joseph B (2002): Hepatocyte transplantation: Regulation of cell engraftment in the liver. Kluwer Academic Publishers and Falk Foundation, Hanover, 2002

Gupta S, Roy Chowdhury J (2002): Therapeutic potential of hepatocyte transplantation. *Semin Cell Dev Biol* 13, 439-446

Gupta S, Vemuru RP, Lee CD, Yerneni P, Aragona E, Burk RD (1994): Hepatocytes exhibit superior transgene expression after transplantation into liver and spleen compared with peritoneal cavity or dorsal fat pad: implications for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 5, 959-967

Gupta S, Rajvanshi P, Lee CD (1995): Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci* 92, 5860-5864

Gupta S, Vasa SRG, Rajvanshi P, Zuckier LS, Palestro CJ, Bhargava KK (1997): Analysis of hepatocyte distribution and survival in vascular beds with cells marked by ^{99m}Tc or endogenous dipeptidyl peptidase IV activity. *Cell Transplant* 6, 377-386

Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM (1999 a): Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology* 29(2), 509-519

Gupta S, Gorla GR, Irani AN (1999 b): Hepatocyte transplantation: emerging insights into mechanisms of liver repopulation and their relevance to potential therapies. *Hepatology* 30, 162-170

Gupta S, Bhargava KK, Novikoff PM (1999 c): Mechanisms of cell engraftment during liver repopulation with hepatocyte transplantation. *Semin Liver Dis* 19, 15-26

Gupta S, Rajvanshi P, Aragona E, Lee CD, Yerneni PR, Burk RD (1999 d): Transplanted hepatocytes proliferate differently after CCl₄ treatment and hepatocyte growth factor infusion. *Am J Physiol* 276, G629-38.

Gupta S, Rajvanshi P, Malhi H, Slehria S, Sokhi RP, Vasa SR, Dabeva M, Shafritz DA, Kerr A (2000): Cell transplantation causes loss of gap junctions and activates GGT expression permanently in host liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, 815-826

Henne-Bruns D, Dürig M, Kremer B: *Duale Reihe Chirurgie*. 2. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2003

Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, Bilodeau M (2004): Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology* 39, 1110-1119

Hyon SH, Ceballos MC, Barbich M, Groppa R, Grosembacher L, Vieiro MM, Barcan L, Algranati S, Litwak L, Argibay PF (2004): Effect of the embolization of completely unpurified islets on portal vein pressure and hepatic biochemistry in clinical practice. *Cell Transplant* 13, 61-65

Jaeschke H (1997): Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol* 273, 602-11

Jaeschke H (2003): Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(1), 15-26

Joseph B, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, Mc Cuskey RS, Gupta S (2002): Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology* 123, 1677-1685

Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM (2005): Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. *Cell Transplant* 14, 31-40

Kohya N, Kitajima Y, Jiao W, Miyazaki K (2003): Effects of E-cadherin transfection on gene expression of a gallbladder carcinoma cell line: repression of MTS1/S100A4 gene expression. *Int J Cancer* 104, 44-53

Kusano M, Mito M (1982): Observations on the fine structure of long survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 82, 616-628

Laconi E, Sarma DS, Pani P (1995): Transplantation of normal hepatocytes modulates the development of chronic liver lesions induced by a pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Carcinogenesis* 16, 139-42

Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA (1998): Long-term, near total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol* 153, 319-329

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: *Molecular Cell Biology*. 4th Bk&Cdr edition, W. H. Freeman, New York, USA 2000.

Malhi H, Gupta S (2001): Hepatocyte transplantation: new horizons and challenges. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 8, 40-50

Malhi H, Annamaneni P, Slehria S, Joseph B, Bhargava KK, Palestro CJ, Novikoff PM, Gupta S (2002): Cyclophosphamid Disrupts Hepatic Sinusoidal Endothelium and Improves Transplanted Cell Engraftment in Rat Liver. *Hepatology* 36, 112-121

Markus PM, Becker H (1999 a): Die Regeneration der Leber – oder warum Prometheus überlebte. *Viszeralchirurgie* 34, 117-122

Markus PM, Becker H (1999 b): Hepatocelluläre Transplantation – von den Anfängen bis zum klinischen Einsatz. *Chirurg* 70, 162-168

Markus PM, Koenig S, Krause P, Becker H (1997): Selective intraportal transplantation of Dil-marked rat hepatocytes. *Cell Transplant* 6, 455-462

Michalopoulos G: Hepatocyte growth factor in liver growth and differentiation. In: Strain AJ, Diehl AM. Editors *Liver Growth and Repair*. Chapman&Hall, London, 1998, 219-239

Mignon A, Guidotti JE, Mitchell C, Fabre M, Wernet A, De La Coste A, Soubrane O, Gilgenkrantz H, Kahn A (1998): Selective repopulation of normal mouse liver by Fas/CD95-resistant hepatocytes. *Nat Med* 4(10), 1185-1188

Overturf K, Al-Dhalimy M, Manning K, Ou CN, Finegold M, Grompe M (1998): Ex vivo hepatic therapy of a mouse model of Hereditary Tyrosinemia Type I. *Hum Gene Ther* 10;9(3), 295-304

Pennisi PA, Kopchick JJ, Thorgeirsson S, LeRoith D, Yakar S (2004): Role of growth hormone (GH) in liver regeneration. *Endocrinology* 145 (10), 4748-55

Piechocki MP, Toti RM, Fernstrom MJ, Burk RD, Ruch RJ (2000): Liver cell-specific transcriptional regulation of connexin 32. *Biochem Biophys Acta* 1491 (1-3), 107-22

Ponder KP, Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, Woo SLC (1991): Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1217-1221

Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S (1996): Studies of liver repopulation using the dipeptidyl peptidase IV deficient rat and other rodents: cell size and structure relationships regulate capacity for increased transplanted hepatocyte mass in the liver lobe. *Hepatology* 23, 482-496

Ray S, Chattopadhyay N, Biswas N, Chatterjee A (1999): Regulatory molecules in tumor metastasis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 18(4), 251-9

Roskams TA, Libbrecht I, Desmet VJ (2003): Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis* 23, 385-396

Seglen PO (1976): Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83

Selden C, Calnan D, Morgan N, Wilcox H, Carr E, Hodgson HJF (1995): Histidinemia in mice: a metabolic defect treated using a novel approach to hepatocellular transplantation. *Hepatology* 21, 1405-1412

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983): Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT (2001): Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 181, 160-166

Sigal SH, Rajvanshi P, Gorla GR, Sokhi RP, Saxena R, Gebhard DR Jr, Reid LM, Gupta S (1999): Partial hepatectomy-induced polyploidy attenuates hepatocyte replication and activates cell aging events. *Am J Physiol* 276, 1260-72

Slehria S, Rajvanshi P, Ito Y, Sokhi R, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S (2002): Hepatic Sinusoidal Vasodilators improve transplanted cell engraftment and ameliorate microcirculatory perturbations in the liver. *Hepatology* 35, 1320-1328

Spinelli SV, Rodriguez JV, Quintana AB, Mediavilla MG, Guibert EE (2002): Engraftment and function of intrasplenically transplanted cold stored rat hepatocytes. *Cell Transplant* 11, 161-168

Stamatoglou SC, Hughes RC (1994): Cell adhesion molecules in liver function and pattern formation. *FASEB J* 8, 420-427

Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, Miele L, Pisarov LA, Dorko K, Thompson MT, Reyes J (1997): Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 29, 2103-2106

Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, Ito H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Morita Y, Miyazaki M (2004): Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice. *Hepatology* 39(3), 699-710

Thompson NL, Hixson DC, Callanan H, Panzica M, Flanagan D, Faris RA, Hong WJ, Hartel-Schenk S, Doyle D (1991): A Fischer rat substrain deficient in dipeptidyl peptidase IV activity makes normal steady-state RNA levels and an altered protein. Use as a liver-cell transplantation model. *Biochem J* 273, 497-502

Unwin PN, Zampighi G (1980): Structure of the junction between communicating cells. *Nature* 283, 545-549

Wack KE, Ross MA, Zegarra V, Sysko LR, Watkins SC, Stolz DB (2001): Sinusoidal ultrastructure evaluated during the revascularization of regenerating rat liver. *Hepatology* 33, 363-378

Yamaoka K, Nouchi T, Kohashi T, Marumo F, Sato C (2000): Expression of gap junction protein connexin 32 in chronic liver diseases. *Liver* 20(2), 104-7

Yamazaki S, Miki K, Hasegawa K, Sata M, Takayama T, Makuuchi M (2003): Sera from liver failure patients and a demethylating agent stimulate transdifferentiation of murine bone marrow cells into hepatocytes in coculture with nonparenchymal liver cells. *J Hepatol* 39, 17-23

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation fanden Eingang in die folgende Publikation:

Koenig S, Stoesser C, Krause P, Becker H, Markus PM (2005): Liver repopulation after hepatocellular transplantation: integration and interaction of transplanted hepatocytes in the host. Cell Transplant. 14(1), 31-40

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die mir durch kompetente Ratschläge, konstruktive Kritik und verlässliche Mitarbeit bei der Anfertigung dieser Arbeit zur Seite standen und die mich auch in schwierigen Situationen weiterhin unterstützt haben.

Prof. Dr. Heinz Becker als Leiter der Abteilung Allgemein Chirurgie an der Universität Göttingen möchte ich insbesondere für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes danken.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Frau Dr. Sarah König für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung dieser Arbeit sowie für die Einführung in die Arbeitsmethoden. Sie stand mir kritisch und konstruktiv bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite und unterstützte mich hilfreich bei der Anfertigung des Manuskriptes. Für die Unterstützung bei fachlichen Problemen und Fragen möchte ich mich weiterhin bei Frau Dr. Petra Krause bedanken.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich auch Frau Sabine Wilde und Frau Roswitha Streich, den medizinisch-technischen Assistentinnen des chirurgischen Labors der Abteilung Allgemein Chirurgie, für die freundschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit und die tatkräftige Hilfe bei den Versuchsdurchführungen dieser Arbeit.

Für die freundliche Mithilfe bei der Durchführung der FACS-Analysen möchte ich mich bei Frau Susan Dingeldein und Herrn Jun.-Prof. Dr. Gerald Wulf aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie bedanken. Bei Frau PD. Dr. Frauke Alves aus der Abteilung Hämatologie und Onkologie bedanke ich mich für die freundliche Nutzungsmöglichkeit des Fluoreszenzmikroskops.

Lebenslauf

Am 16. Februar 1978 wurde ich als Tochter von Dres. Brigitte und Lutz Stößer in Erfurt geboren. Ab September 1984 besuchte ich die Polytechnische Oberschule 26 in Erfurt und wechselte dort im August 1991 auf das Heinrich-Mann-Gymnasium, wo ich im Juli 1996 das Abitur ablegte. Anschließend besuchte ich für ein Jahr das Colchester Institute/UK, wo ich das AS-level in Human Biology sowie das „Cambridge Advanced“ und „Cambridge Proficiency Certificate“ in Englisch ablegte.

Von April 1998 bis Oktober 2004 studierte ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, an der ich meine vorärztliche Prüfung 03/2000, den 1. Teil der Ärztlichen Prüfung 03/2001, den 2. Teil 08/2003 und den 3. Teil 10/2004 bestand. Die Approbation als Ärztin wurde mir 11/2004 erteilt.

Im Rahmen meines Studiums famulierte ich im Krankenhaus „Dritter Orden“ in München, im Colchester General Hospital/UK, im Virginia Mason Hospital Seattle/USA und am Helios-Klinikum in Erfurt. Mein Praktisches Jahr habe ich am Universitätsklinikum Göttingen und am Evangelischen Krankenhaus Oldenburg mit dem Wahlfach HNO absolviert.

Während meiner Studienzeit engagierte ich mich in der Fachschaftsgruppe „Unabhängige Mediziner“. In diesem Rahmen habe ich zahlreiche Orientierungsphasen und die Fachschaftszeitung „Äskulap“ als Redakteurin mitgestaltet. Neben anderen Funktionen in der studentischen Selbstverwaltung war ich Studierendenvertreterin im Fakultätsrat Medizin.

Die vorliegende Arbeit habe ich von April 2001 unter Betreuung von Frau Dr. S. König in der Abteilung Allgemeinchirurgie (Leiter: Prof. Dr. med. H. Becker) im Zentrum Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

In meiner Freizeit lese ich, jogge und fahre sehr gern Fahrrad. Außerdem begeistere ich mich aktiv für Treckingreisen und interessiere mich für das aktuelle Welt- und Zeitgeschehen.

Seit Februar 2005 arbeite ich als Assistenzärztin in der Hals-Nasen-Ohrenklinik im Klinikum Minden/Westfalen.