

Entwicklung von zwei humanen Stammzelllinien nach Transplantation in die Leber von immundefizienten Mäusen

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Friedrich Jakob Hammersen
geboren am 28.09.1981 in Heidelberg

angefertigt am: Universitätsklinikum Leipzig AöR
Institut für Pathologie
Liebigstr. 26, 04103 Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. L-C. Horn

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.05.2012

Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Zusammenfassung1

Abkürzungsverzeichnis2

1 Einleitung.....4

1.1 Hepatozyten in Klinik und Forschung4

1.2 Begrenzte Verfügbarkeit humaner Hepatozyten – Stammzellen als Alternative5

1.3 *In vivo* Studien8

1.4 Differenzierung oder Fusion der transplantierten Zellen9

1.5 Xenogene Transplantationsstudien10

2 Zielsetzung12

3 Material und Methoden.....13

3.1 Gewinnung und Aufbereitung der Stamm- und Vorläuferzellen13

3.1.1 Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen13

3.1.2 Aus Blutmonozyten *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten13

3.2 Markierung der Zellen mit CM-DiI Membranfarbstoff14

3.3 Transplantation der Stamm- und Vorläuferzellen14

3.3.1 Versuchstiere.....14

3.3.2 Transplantation ins Leberparenchym15

3.3.3 Transplantation in die Pfortader.....15

3.4 Explantation und Fixierung der Lebern15

3.5 Immunhistochemische Färbung auf humanes Albumin.....16

3.5.1 Entparaffinisierung und Hydrierung17

3.5.2 Antigendemaskierung.....17

3.5.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und endogener Enzyme17

3.5.4 Inkubation mit Primärantikörper gegen Humanalbumin.....18

3.5.5 ABC-Methode zur Detektion des Primärantikörpers18

3.5.6 Inkubation mit Sekundärantikörper.....19

3.5.7 ABC-Lösung19

3.5.8 Inkubation mit Diaminobenzidin19

3.5.9 Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun20

3.5.10 Dehydrieren und Eindecken.....20

3.6 *In situ* Hybridisierung20

3.6.1	Dehydrierung und Antigendemaskierung.....	21
3.6.2	Sondenvorbereitung, Denaturierung und Hybridisierung	21
3.6.3	Stringentes Waschen	22
3.6.4	Blocken unspezifischer Bindungsstellen	22
3.6.5	Detektion der Sonden	22
3.6.6	Kernfärbung mit DAPI	23
3.6.7	Eindecken der Proben.....	23
3.7	Kombination von <i>in situ</i> Hybridisierung und Immunhistochemie	24
3.8	Histologische Standardfärbungen	24
3.8.1	Eisennachweis mit der Berliner Blau Reaktion	24
3.8.2	PAS-Färbung.....	25
3.9	Mikroskopie.....	26
3.9.1	Mikroskop und Kamera.....	26
3.9.2	Methodik des Mikroskopierens.....	26
3.10	Herstellung der Mouse-Major-Satellite-Sonde.....	26
3.10.1	Maus-DNS und Primer	27
3.10.2	Gelelektrophorese.....	27
3.10.3	PCR zur Herstellung der MMS-Sequenz.....	28
3.10.4	Gel-Extraktion des PCR-Produktes.....	29
3.10.5	PCR zur Herstellung der DIG-markierten Sonde	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Identifikation der transplantierten Zellen.....	31
4.1.1	CM-DiI-markierte Zellen.....	31
4.1.2	Genetische Charakterisierung durch <i>in situ</i> Hybridisierung.....	32
4.1.3	Sensitivität und Spezifität der ISH.....	34
4.2	Analyse von Neohepatozyten nach unterschiedlicher Verweildauer in Lebern von NOD/SCID-Mäusen.....	36
4.2.1	Zwei Tage nach Transplantation.....	36
4.2.2	21 Tage nach Transplantation	38
4.2.3	60 Tage nach Transplantation.....	39
4.3	Analyse adhärent proliferierender Nabelschnurblutzellen nach unterschiedlicher Verweildauer in Lebern von NOD/SCID-Mäusen	40

4.3.1	Semiquantitative Analyse der Alu-positiven Kerne.....	41
4.3.2	Mikroskopische Auswertung	41
4.4	Nachweis von Humanalbumin.....	44
4.4.1	Scheintransplantierte NOD/SCID-Mäuse als Negativkontrolle	44
4.4.2	Transplantation humaner Hepatozyten.....	45
4.4.3	Immunhistochemie der Stammzellen vor Transplantation	46
4.5	Immunhistochemie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von Neohepatozyten	47
4.5.1	Semiquantitative Analyse nach Transplantation von Neohepatozyten	48
4.5.2	Zwei Typen Humanalbumin-positiver Zellen.....	48
4.6	Immunhistochemie nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen	49
4.6.1	Semiquantitative Analyse nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen ..	50
4.6.2	Mikroskopische Auswertung	51
4.7	Untersuchung von Typ I Zellen mit histologischen Standardfärbungen	52
4.7.1	PAS-Färbung zur Darstellung von Glykogenspeicherung	53
4.7.2	Eisennachweis durch Berliner Blau Reaktion.....	53
4.8	Genetischer Ursprung von Humanalbumin-positiven Zellen.....	54
4.8.1	Kombination von <i>in situ</i> Hybridisierung und Immunhistochemie auf humanes Albumin	54
4.8.2	Genetische Charakterisierung von Typ I Zellen	55
4.8.3	Genetische Charakterisierung von Typ II Zellen.....	56
5	Diskussion	58
5.1	Aktuelle Studien zur Transplantation von Stammzellen in die Leber von Versuchstieren	58
5.2	Identifikation der transplantierten Zellen.....	62
5.3	Identifikation der transplantierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation	63
5.4	Immunhistochemischer Nachweis humanen Albumins als leberzellspezifischer Marker 66	
5.4.1	Humanalbumin-positiv Typ I Zellen	67
5.4.2	Humanalbumin-positiv Typ II Zellen.....	69
6	Zusammenfassung	72

7	Literaturverzeichnis	74
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	80
8.1	Abbildungsverzeichnis	80
8.2	Tabellenverzeichnis	81
9	Anhang	83
9.1	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	83
9.2	Publikationen	84
9.3	Danksagung	85

Bibliographische Zusammenfassung

Hammersen, Friedrich Jakob

Entwicklung von zwei humanen Stammzelllinien nach Transplantation in die Leber von immundefizienten Mäusen

Universität Leipzig, Dissertation

90 Seiten, 68 Literaturangaben., 21 Abbildungen., 8 Tabellen.

Referat:

Hepatozyten sind von großer Bedeutung in Klinik und Forschung. Da sie derzeit nicht kultiviert werden können wird vielfach versucht sie aus Vorläuferzellen zu generieren. In dieser Arbeit wurde die Entwicklung von zwei Stammzelllinien in einem xenogenen Transplantationsmodell mit immundefizienten Mäusen untersucht. Verwendet wurden Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut und vordifferenzierte humane Monozyten, sogenannte Neohepatozyten. Es wurden jeweils 750.000 dieser Zellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen transplantiert und die Lebern im Verlauf explantiert. Die Identifikation der transplantierten Zellen im Gewebeschnitt gelang durch den Membranfarbstoff CM-DiI. Zur genetischen Charakterisierung wurde eine *in situ* Hybridisierung mit human- bzw. mausspezifischen Gensonden etabliert. So konnten die transplantierten Zellen sicher in den Mauslebern detektiert werden. Im Weiteren wurde immunhistochemisch humanes Albumin in Mauslebern nachgewiesen. Humanes Albumin diente als Differenzierungsmarker und zeigt eine Entwicklung der transplantierten Zellen in Richtung Hepatozyten an. Interessanterweise wurden bei der Analyse beider Zelllinien zwei Typen Humanalbumin-positiver Zellen beobachtet: Typ I Zellen traten meist in Gruppen auf, waren kleiner als Hepatozyten und trugen einen dichten, dezentral gelegenen Kern. Sie lagen im Parenchym oder in kleineren Gefäßen und waren in der Lage, wie Hepatozyten, Glycogen und Eisen zu speichern. Typ II Zellen traten einzeln auf und glichen in ihrer Form exakt den Hepatozyten. Durch die Kombination von Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung konnten die Humanalbumin-positiven Zellen genetisch charakterisiert werden. Typ I Zellen trugen einen menschlichen Kern. Ihre Entstehung kann durch Teildifferenzierung der Stammzellen erklärt werden. Typ II Zellen wiesen einen Mausekern auf. Ein möglicher Entstehungsmechanismus ist der horizontale Gentransfer nach Zerfall der transplantierten Zellen im Zuge einer Immunreaktion. Der formale Nachweis eines solchen Phänomens steht noch aus.

Abkürzungsverzeichnis

2-AAF	2-Acetylaminofluorene
ABC	avidin biotin complex
α -FP	alpha-Fetoprotein
Alu	repetitive DNS-Sequenz aus dem Genom von Primaten, die durch das Restriktionsenzym <i>Arthrobacter luteus</i> I geschnitten wird
ALV	akutes Leberversagen
Aqua dest.	Aqua destillata
β -FGF	beta fibrocyte growth factor
BSA	bovine serum albumin
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
CD-Marker	cluster of differentiation, Oberflächenantigen
CK18	Zytokeratin 18
CM-DiI	chloromethylbenzamido derivative of octadecylindocarbocyanine, Membranfluoreszenzfarbstoff, rot
CYP2B6	Hämoprotein der Cytochrom P450 Familie, Subtyp 2B6
Cy2	Carbocyanin-2, Fluoreszenzfarbstoff, grün
Cy3	Carbocyanin-3, Fluoreszenzfarbstoff, rot
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6 Diamidino-2-Phenylindol, Fluoreszenzfarbstoff, Blau
DIG	Digoxygenin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPPIV	Dipeptidyl-Peptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
FAH	Fumarylacetoacetat Hydrolase
Fc	crystalline fragment, Struktureinheit des Antikörpers
FCS	fetal calf serum
FGF-4	fibrocyte growth factor 4
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HepG2	hepatozelluläre Karzinomlinie

HepPar1	humanspezifisches Leberantigen, Klon OCH15B
HGF	hepatocyte growth factor
IHC	Immunhistochemie
IL3	Interleukin 3
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
LDL	low density lipoproteins
MAPC _s	multipotent adult progenitor cells
M-CSF	macrophage colony-stimulating growth factor
MMS	mouse major satellite
MNC	mononuclear cell
NOD	non obese diabetes
PAS	periodic acid-Schiff stain
PBS	phosphate buffered saline
PCMOs	programmable cells of monocytic origin
PROD-Aktivität	Pentoxeresorufin-O-Dealkylase-Aktivität
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SCID	severe combined immune deficiency
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPF	specific pathogen free
SSC	saline sodium citrate
Taq-Polymerase	hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borat Ethylendiamintetraacetat
TBS	tris buffered saline
UV	ultra violett

1 Einleitung

1.1 Hepatozyten in Klinik und Forschung

Die Leber ist das zentrale Organ vieler Stoffwechselwege. Funktionsträger für den Großteil der spezifischen Leberfunktionen sind die Hepatozyten. Von seiten mehrerer Fachgebiete besteht großes Interesse an diesen Zellen. In der Pharmakologie sind sie als Forschungsinstrument bereits gut etabliert (Gómez-Lechón *et al.* 2008; Ringel *et al.* 2005; Reder-Hilz *et al.* 2004; Gómez-Lechón *et al.* 2003; Hengstler *et al.* 2000a; Hengstler *et al.* 2000b; Li *et al.* 1999) und in der klinischen Forschung werden sie zunehmend als vielversprechendes Therapeutikum angesehen (Puppi *et al.* 2008; Fisher & Strom 2006; Nussler *et al.* 2006; Mazaris *et al.* 2005; Bilir *et al.* 2000; Strom *et al.* 1997a; Strom *et al.* 1997b; Mito *et al.* 1993). Derzeit ist für viele Lebererkrankungen die Lebertransplantation die einzige kurative Therapie. Diese Methode ist jedoch durch den Mangel an Spenderorganen limitiert: im Jahr 2007 standen in Deutschland bei 1590 Anträgen auf Lebertransplantation nur 1108 Organe zur Verfügung (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2008). Als eine alternative Therapieoption rückte in den letzten Jahren die Transplantation von Hepatozyten in den Fokus vieler Arbeitsgruppen (Nussler *et al.* 2006; Fisher & Strom 2006; Mazaris *et al.* 2005). Ein Vorteil der zellbasierten Therapien ist die minimale Invasivität und die Möglichkeit, die Therapie mehrfach zu wiederholen (Nussler *et al.* 2006). Erste klinische Erfahrungen zeigen, dass für die Transplantation von humanen Hepatozyten verschiedene Lebererkrankungen in Frage kommen: in der Behandlung von Patienten mit ALV (*akutes Leberversagen*) wurde nach Infusion von humanen Hepatozyten der Ammoniakspiegel im Serum und die Prothrombinzeit reduziert. So konnte die Zeit bis zur Organtransplantation überbrückt und die Sterblichkeit gegenüber der Kontrollgruppe reduziert werden. (Bilir *et al.* 2000; Strom *et al.* 1997b; Mito *et al.* 1993). Ein weiteres Einsatzgebiet für die Transplantation von Hepatozyten sind Stoffwechselerkrankungen der Leber. In einer Studie von Puppi *et al.* wurden einer Patientin mit Ornithin-Transcarbamylase-Mangel $1,74 \times 10^9$ Hepatozyten infundiert. Über 6 Monate wurden bei normaler Eiweißzufuhr keine erhöhten Ammoniak- und Harnstoffspiegel gemessen. Wachstum und neurologische Entwicklung der Patientin waren unter der Therapie normgerecht (Puppi *et al.* 2008). Der Einsatz von Hepatozyten in der Behandlung von metabolischen Lebererkrankungen ist noch derzeit noch

nicht etabliert, jedoch ist die Studienlage breit und zeigt ermutigende Ergebnisse (Nussler *et al.* 2006; Burlina 2004).

Neben der klinischen Anwendung stellen humane Hepatozyten in der pharmakologischen und toxikologischen Forschung ein gut etabliertes Werkzeug dar. Mithilfe dieser Zellen können Stoffwechselwege, Metabolite von Pharmaka und anderen Fremdstoffen *in vitro* bestimmt werden (Gómez-Lechón *et al.* 2008; Ringel *et al.* 2005, Reder-Hilz *et al.* 2004; Gómez-Lechón *et al.* 2003; Hengstler *et al.* 2000a; Hengstler *et al.* 2000b; Li *et al.* 1999). So können Tierversuche und klinische Studien, z.B. in der Arzneimittelzulassung, effektiver durchgeführt werden. Der breite Einsatz in der Forschung und vielversprechende Studienergebnisse aus der Klinik erzeugen eine starke Nachfrage nach humanen Hepatozyten. Jedoch kann ihr Potenzial derzeit nicht ausgeschöpft werden.

1.2 Begrenzte Verfügbarkeit humaner Hepatozyten – Stammzellen als Alternative

Dem hohen Bedarf an humanen Hepatozyten in Klinik und Forschung steht die mangelnde Verfügbarkeit dieser Zellen gegenüber (Hengstler *et al.* 2005), was von Nussler *et al.* sogar als das derzeit größte Hindernis der Leberzelltherapie beschrieben wird (Nussler *et al.* 2006). Obwohl das Leberparenchym *in vivo* eine hohe Regenerationsfähigkeit besitzt und viele der kritischen Wachstumsfaktoren bekannt sind (Michalopoulos & DeFrances 1997), ist es noch nicht gelungen, humane Hepatozyten zur Proliferation anzuregen und damit *in vitro* zu expandieren (Hengstler *et al.* 2005). Auf der Suche nach einer Alternative zur *in vitro*-Proliferation ist in den letzten 10 Jahren die Generierung von Hepatozyten aus extrahepatischen Stamm- und Vorläuferzellen zum Gegenstand vieler Studien geworden (Brulport *et al.* 2007; Hengstler *et al.* 2005; Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b; Willenbring *et al.* 2004; Kakinuma *et al.* 2003). Gegenüber primären Hepatozyten können extrahepatische Stammzellen aus diversen Quellen gewonnen und darüber hinaus *in vitro* gut expandiert werden. Als Quellen stehen Nabelschnurblut (Kakinuma *et al.* 2003; Newsome *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003; Beerheide *et al.* 2002), peripheres Blut Erwachsener (Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b) oder Knochenmark (Willenbring *et al.* 2004) zur Verfügung. So kann eine hohe Verfügbarkeit gesichert werden. Einen weiteren Vorteil bietet der

Transplantationsmodus: durch eine autologe Transplantation von Stamm- und Vorläuferzellen könnten Probleme der Langzeitimmunsuppression umgangen werden (Nussler *et al.* 2006).

Eine Strategie zur Generierung von Hepatozyten ist es, Stamm- und Vorläuferzellen *in vitro* zu differenzieren. In den letzten Jahren wurden viele Untersuchungen zur *in vitro* Differenzierung von Stammzellen zu Hepatozyten durchgeführt (Hengstler *et al.* 2005). Hinsichtlich der verwendeten Stammzellen und der Differenzierungsprotokolle können verschiedene Studien klassifiziert werden. Zhao *et al.* nutzte peripher entnommenes Blut erwachsener Versuchspersonen. Nach Zentrifugation wurden die adhärent proliferierenden Monozyten kultiviert und anschließend einem zweistufigen Differenzierungsprotokoll unterzogen. Im ersten Schritt wurde M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) für 14 Tage, dann HGF (*hepatocyte growth factor*) für 5-7 Tage als Wachstumsfaktor eingesetzt. Unter dieser Behandlung differenzierten sich monozytäre, runde Zellen. Immunhistochemisch konnten in 75% bzw. 81% dieser Zellen die leberzellspezifischen Proteine Albumin bzw. α -FP (*alpha-Fetoprotein*) nachgewiesen werden (Zhao *et al.* 2003). Lee *et al.* verwendete adhärent proliferierende Zellen aus dem Knochenmark und aus Nabelschnurblut und kultivierte diese in einem komplexen dreistufigen Differenzierungsprotokoll. In den Schritten kamen u.a. HGF, β -FGF (*beta fibrocyte growth factor*), Dexamethason sowie Insulin zum Einsatz. Mittels RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) wurden nach der Differenzierung verschiedene leberzellspezifische Markerproteine (z.B. α -FP, Glucose-6-Phosphatase, CK18 (*Cytokeratin 18*) und CYP2B6 (*Hämoprotein der Cytochrom P450 Familie, Subtyp 2B6*) nachgewiesen. Zusätzlich sezernierten die Zellen Albumin und Harnstoff und waren in der Lage, LDL (*low density lipoproteins*) aufzunehmen (Lee *et al.* 2004). Schwartz *et al.* isolierte anhand bestimmter CD-Marker (*cluster of differentiation*) Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von Erwachsenen. Diese sog. MAPCs (*multipotent adult progenitor cells*) wurden für 14 Tage in einem FGF-4 (*fibrocyte growth factor 4*) und HGF-haltigen Differenzierungsmedium kultiviert und exprimierten daraufhin humanes Albumin. Zudem wurden von Schwartz *et al.* an den so vordifferenzierten Zellen PROD-Aktivität (*Pentoxeresorufin-O-Dealkylase-Aktivität*) als Maß für die Aktivität der CYP2B-Isoenzyme untersucht (Schwartz *et al.* 2002). In der Leber wird Pentoxeresorufin im Phase I Stoffwechsels durch Cytochrom-P450-haltige CYP2B-Isoenzyme dealkyliert. CYP2B-Enzyme sind durch Phenobarbital induzierbar. Zum Nachweis eines induzierbaren Phase I Metabolismus wurde nach viertägiger Inkubation der MAPCs mit Phenobarbital eine vom

Ausgangswert um 1,4-fach erhöhte PROD-Aktivität nachgewiesen. Schwartz *et al.* schlussfolgerten daraus eine induzierbare CYP2B-Aktivität in Albumin-sezernierenden Zellen und leitete daraus ab, dass sich aus den MAPCs sog. „funktionelle Hepatozytenartige Zellen“ entwickelt hätten (Schwartz *et al.* 2002). Solche optimistischen Deutungen sind jedoch kritisch zu bewerten. Um das Differenzierungspotential verschiedener Zelllinien zu beurteilen ist es sinnvoll sie nach der Differenzierung in funktionellen Tests mit Hepatozyten zu vergleichen (Hengstler *et al.* 2005). Dabei besteht das Problem, dass humane Hepatozyten in Abhängig von den Spendern eine hohe Variabilität bei metabolischen Untersuchungen aufweisen (Castell *et al.* 2006; Hengstler *et al.* 2005). Dies kann u.a. durch genetische Polymorphismen erklärt werden (Hengstler *et al.* 1999). Trotz der funktionellen Variabilität einzelner Hepatozytenchargen lassen sich Faktoren zusammenfassen, die eine Hepatozyte funktionell definieren. Zu diesen Faktoren gehören:

- Ein induzierbarer Fremdstoffmetabolismus, der sich aus einer Cytochrom P450-Isozym Aktivität (Phase I) und einer Transferase-Aktivität (Phase II) zusammensetzt
- Die Enzymausstattung zur Synthese von Harnstoff und Galle
- Die Synthese von Albumin, Lipoproteinen, Fibrinogen und weiteren Koagulationsfaktoren
- Die Fähigkeit zur Speicherung von Glucose als Glykogen, der fettlöslichen Vitamine sowie Eisen und Kupfer (Hengstler *et al.* 2005)

Vergleicht man vordifferenzierte Stammzellen anhand dieser Kriterien mit *in vitro* kultivierten Hepatozyten, können Aussagen getroffen werden, inwiefern sich diese Zellen zu funktionellen Hepatozyten entwickelt haben. Von Ruhnke *et al.* wurden Monozyten aus dem Blut von Erwachsenen in einem zweistufigen Protokoll zu sog. Neohepatozyten differenziert. In einem ersten Dedifferenzierungsschritt wurden die Monozyten mit M-CSF, β -Mercaptoethanol und IL3 (*Interleukin 3*) kultiviert. Nach 6 Tagen hatten die Zellen fibroblastenartige Form angenommen und werden in diesem Stadium als PCMOs (*programmable cells of monocytic origin*) beschrieben. Die PCMOs wurden im Anschluss 14 Tage mit FGF-4 (*fibrocyte growth factor 4*) inkubiert. Nach diesem Differenzierungsschritt zeigten die Zellen eine hexagonale Form. Mittels RT-PCR und immunhistochemischen Färbungen konnten hepatische Markerproteine wie Albumin, cytochromhaltige Enzyme (CYP3A4, CYP2B6, CYP2C9) des Phase I Stoffwechsels, der Gerinnungsfaktor II sowie

Asialoglycoprotein nachgewiesen werden. Im Weiteren wurden ausgewählte Stoffwechsel- und Syntheseleistungen gemessen. Die Albumin- und Harnstoffproduktion, sowie Phase I und II Stoffwechselreaktionen der Neohepatozyten waren vergleichbar mit *in vitro* kultivierten Hepatozyten. Auch konnte der Fremdstoffmetabolismus durch Induktoren verstärkt werden. Die CYP3A4 Aktivität der Neohepatozyten war jedoch deutlich geringer als die der Hepatozyten (Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b).

1.3 *In vivo* Studien

Neben den *in vitro* Studien wurde von mehreren Arbeitsgruppen die Generierung von Hepatozyten aus Stamm- und Vorläuferzellen nach der Transplantation in die Leber von Versuchstieren untersucht. Diese Studien haben den Vorteil, dass die transplantierten Zellen mit Sauerstoff, Nährstoffen und Wachstumsfaktoren der Leber versorgt werden. Die Entwicklung der transplantierten Zellen findet so in der Mikroumgebung der Leber statt. Petersen lieferte 1999 so den ersten Hinweis, dass hämatopoetische Stammzellen fähig sind, sich zu Hepatozyten zu differenzieren (Petersen *et al.* 1999). In seinen Studien wurden weibliche Ratten mit einer letalen Dosis bestrahlt und anschließend mit Knochenmark männlicher Ratten transplantiert. Im Anschluß wurde mit 2-AAF (*2-Acetylaminofluorene*) und CCl₄ (*Tetrachlorkohlenstoff*) ein Leberschaden in den transplantierten Versuchstieren verursacht. Nach einer Regenerationsphase konnte Petersen *et al.* in den Lebern dieser Versuchstiere Hepatozyten nachweisen, die ein Y-Chromosom trugen. Damit zeigte er, dass die transplantierten Knochenmarkszellen zur Regeneration der Leber beigetragen haben. In einem weiteren Ansatz konnte Petersen *et al.* zeigen, dass in DPPIV-negativen (*Dipeptidyl-Peptidase IV*) Ratten nach Transplantation mit DPPIV-positivem Spendermark und Leberschädigung DPPIV exprimiert wurde (Petersen *et al.* 1998; Petersen *et al.* 1999). Die Expression eines leberzellspezifischen Proteins stellt einen Hinweis auf die Funktionalität der transplantierten Zellen als Hepatozyten dar. Von vielen weiteren Arbeitsgruppen wurden Nagetiere mit extrahepatischen Stammzellen transplantiert. Anhand unterschiedlicher Marker und Reporterproteinen, wie z.B. dem Y-Chromosom (Theise *et al.* 2000), EGFP (*enhanced green fluorescent protein*; Harris *et al.* 2004) oder β -Galactosidase (Alvarez-Dolado *et al.* 2003), konnten die transplantierten Zellen in den Lebern der Versuchstiere nachgewiesen werden. Eine Aussicht auf die klinische Nutzbarkeit von extrahepatischen Stammzellen

konnte Lagasse *et al.* mit dem FAH^{-/-}-Maus-Modell (*Fumarylacetoacetat Hydrolase*) demonstrieren (Lagasse *et al.* 2000). FAH ist ein leberspezifisches Enzym, das Fumarylacetoacetat in Fumarat umsetzt (Streyer 1995). Wird dieses Enzym in FAH^{-/-}-Mäusen nicht exprimiert, so kommt es zu einer Akkumulation der lebertoxischen Metabolite Fumarylacetoacetat und Maleylazetoacetat, die sich in kurzer Zeit letal auswirkt. Lagasse *et al.* transplantierten FAH^{+/+}-hämatopoetische Stammzellen in FAH-defiziente Mäuse und entzog den Versuchstieren danach ein vor der Akkumulation schützendes Medikament, welches den Tieren zuvor ein Überleben ermöglichte. Unter diesen Bedingungen wurde für die FAH-exprimierenden Zellen ein Selektionsvorteil geschaffen. Nach vier Monaten wurden in Regeneratknoten der Lebern Y-Chromosom-positive Zellen detektiert. Es fanden sich Zellen, die sowohl Albumin als auch FAH exprimierten (Lagasse *et al.* 2000).

1.4 Differenzierung oder Fusion der transplantierten Zellen

Die Expression von Markerproteinen durch Stamm- und Vorläuferzellen setzt jedoch nicht zwingend eine Differenzierung der transplantierten Zellen zu Hepatozyten voraus. Ein weiterer Mechanismus, durch den der Nachweis von Markerproteinen und Chromosomen in den Empfängerlebern erklärt werden kann, ist die Fusion von transplantierten Zellen mit Hepatozyten. Wang *et al.* nutzte in seinen Studien ebenfalls das FAH^{-/-}-Maus-Modell und konnte 80 Zellen des Karyotyps XXXY und 120 Zellen des Karyotyps XXXXY nachweisen. Dies zeigt eine Fusion von diploiden Stammzellen mit diploiden bzw. tetraploiden Empfängerzellen an (Wang *et al.* 2003a; Wang *et al.* 2003b). Auch Vassilopoulos *et al.* und Willenbring *et al.* untersuchten die Empfängerlebern von FAH^{-/-}-Mäusen nach Transplantation mit FAH^{+/+}-Zellen. Beide Arbeitsgruppen identifizierten die Zellfusion als den Entstehungsmechanismus für die untersuchten FAH-positiven Hepatozyten (Vassilopoulos *et al.* 2003; Willenbring *et al.* 2004). Diesen Ergebnissen stehen Arbeiten von Newsome *et al.* und Jang *et al.* entgegen, die in ihren Studien explizit die Transdifferenzierung als Entstehungsmechanismus von Leberzellen aus Nabelschnurblut- bzw. hämatopoetischen Stammzellen beschreiben (Newsome *et al.* 2003; Jang *et al.* 2004). Die Aufklärung des Entstehungsmechanismus der regenerierten Hepatozyten scheint aus klinischer Sicht interessant. So könnten sich Zellen mit Fusionspotential als Vehikel für die Gentherapie eignen. In Frage kämen hier vor allem monogenetische Lebererkrankungen wie

z.B. Morbus Wilson oder die Hämophilie (Hengstler *et al.* 2005). Jedoch würde auch die Identifikation von Zelllinien, die sich zu Hepatozyten transdifferenzieren lassen, weitreichendes Potential für Klinik und Forschung darstellen.

1.5 Xenogene Transplantationsstudien

Die vielversprechenden Ergebnisse der Studien, in denen Stamm- und Vorläuferzellen allogent transplantiert wurden, regte eine Vielzahl von Arbeitsgruppen zu xenogenen Transplantationsstudien an (siehe Tabelle 8, Seite 60). Im Fokus dieser Studien stand das Differenzierungspotential von humanen Stamm- und Vorläuferzellen nach Transplantation in die Leber von Versuchstieren. Wie bei den allogenen Transplantationen können sich die transplantierten Zellen in der Mikroumgebung der Leber entwickeln. Die Zelltransplantation in artfremde Empfängertiere birgt jedoch auch Nachteile. So muss nach xenogener Transplantation mit starken Immunreaktionen gerechnet werden (Nussler *et al.* 2006). Um die Immunreaktion möglichst gering zu halten, wurden von den meisten Arbeitsgruppen immundefiziente Versuchstiere eingesetzt (Hengstler *et al.* 2005). Die verwendeten Tiere waren durch die erbliche Immunschwäche SCID (*severe combined immune deficiency*) in ihrer Abwehr beeinträchtigt. Ein weiteres Problem der xenogenen Transplantation ist die Inkompatibilität von Signalwegen, die für das Wachstum und die Differenzierung der transplantierten Zellen hinderlich sein kann. Die Ergebnisse xenogener Transplantationsstudien sind demnach nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen (Hengstler *et al.* 2005). In den xenogenen Transplantationsstudien wurde unterschiedlich vorgegangen. Humane Stamm- und Vorläuferzellen aus verschiedenen Quellen wurden immungeschwächten Mäusen über die Schwanzvene oder direkt ins Leberparenchym transplantiert. In einigen Arbeiten wurde die Leber der Versuchstiere zuvor chemisch oder durch Strahlung geschädigt. Nach einem Zeitraum von drei Wochen bis sechs Monaten wurden die Lebern explantiert. Trotz der unterschiedlichen Vorgehensweisen kamen die Arbeitsgruppen zu sehr ähnlichen Ergebnissen. In den Präparaten wurden mittels IHC (*Immunhistochemie*) humane Hepatozytenmarker wie z.B. humanes Albumin oder HepPar1 (*humanspezifisches Leberantigen*) nachgewiesen. Häufig wurden die positiven Ergebnisse der IHC durch RT-PCR Untersuchungen bestätigt. In einigen Studien wurden die transplantierten Zellen genetisch mittels FISH (*fluorescence in situ hybridisation*) identifiziert. Newsome *et*

al. untersuchte so auch, ob menschliche mit murinen Zellen fusionierten (Newsome *et al.* 2003).

Die Differenzierung von humanen Stamm- und Vorläuferzellen zu funktionsfähigen Hepatozyten wäre ein „enormer Fortschritt mit hoher klinischer Relevanz“ (Nussler *et al.* 2006). Jedoch konnten in den *in vivo* Studien bis dato nur einige hepatozelluläre Marker nachgewiesen werden. Zusätzlich stehen Untersuchungen der vielfältigen genetischen und funktionellen Charakteristika von Hepatozyten an den transplantierten Zellen noch aus. Auch ist der Entstehungsmechanismus der markertragenden Zellen noch nicht geklärt (Hengstler *et al.* 2005).

2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollte das Schicksal von humanen Stamm- und Vorläuferzellen nach Transplantation in die Leber von Mäusen im Detail untersucht werden. Dazu wurden aus Monozyten vordifferenzierte Neohepatozyten und adhärent proliferierende Nabelschnurblutstammzellen in die Leber von immundefizienten NOD/SCID-Mäusen transplantiert. In einem ersten Schritt sollten die transplantierten Zellen in histologischen Schnitten detektiert werden. Die Zellen sollten anhand des Membranfarbstoffs CM-DiI detektiert und durch den Nachweis von mensch- und mausspezifischer DNS von murinen Zellen identifiziert werden. Mit der Möglichkeit der sicheren Identifikation der transplantierten Zellen sollten Aussagen über die Quantität, Lokalisation und Morphologie im Verlauf nach der Transplantation getroffen werden. Durch den immunhistochemischen Nachweis von humanem Albumin sollte eine Differenzierung der transplantierten Zellen in Richtung Hepatozyten nachgewiesen werden. Humanalbumin exprimierende Zellen sollten nach Quantität, Lokalisation und Morphologie im Verlauf nach der Transplantation beschrieben werden. Durch histologische Färbungen sollte außerdem untersucht werden, ob die transplantierten Zellen wie Hepatozyten Glykogen oder Eisen speichern. In einem letzten Schritt sollten Humanalbumin exprimierende Zellen genetisch charakterisiert werden, um so Hinweise auf ihren Entstehungsmechanismus zu erlangen. Dazu sollte humanes Albumin sowie mensch- und mausspezifische DNS als Kofärbung in einem histologischen Schnitt dargestellt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung und Aufbereitung der Stamm- und Vorläuferzellen

Die Gewinnung, Aufbereitung und Charakterisierung der Stamm- und Vorläuferzellen ist nicht Teil dieser Arbeit. Gleiches gilt für die Transplantation und Explantation. Diese Arbeitsschritte wurden in der Arbeitsgruppe freundlicherweise von Herrn Dr. M. Brulport übernommen. Zum ganzheitlichen Verständnis der Studien werden diese Schritte hier qualitativ, jedoch nicht streng methodisch wiedergegeben.

3.1.1 Adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen

Zur Gewinnung von Stamm- und Vorläuferzellen aus Nabelschnurblut neugoborener Kinder wurde mit Einverständnis der Mütter nach der Geburt aus der Nabelvene Blut entnommen und nach einem Protokoll von Beerheide *et al.* aufbereitet (Beerheide *et al.* 2002). Etwa 50 ml Nabelschnurblut wurden einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen und die MNC (*mononuclear cells*) aus der weißen Interphase mit einer Pipette abgenommen. Die gesammelten MNC wurden in Kulturflaschen ausgesät. Durch regelmäßigen Medienwechsel wurden nicht adhärenz wachsende Zellen abgespült und entfernt. Nach 20-25 Tagen waren Kolonien von adhärenz wachsenden Zellen mit fibroblastenartiger Morphologie zu erkennen. Diese Zellen wurden mit Trypsin aus der Kulturflasche gelöst und aufgeteilt. Ein Teil der Zellen wurde zur weiteren Kultivierung verwendet, der andere Teil wurde von einer kooperierenden Arbeitsgruppe (Dr. D. Spitkovsky, Universität Köln) mittels Durchflusszytometrie auf die Expression bestimmter CD-Marker untersucht. Die untersuchten CD-Marker waren CD10, CD13, CD29, CD31, CD34, CD44, CD49e, CD90w, CD105 und CD146. Vor der Transplantation wurden die Zellen geerntet und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 750.000 Zellen/100µl Medium eingestellt.

3.1.2 Aus Blutmonozyten *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten

Aus peripheren Blutmonozyten können *in vitro* in einem zweistufigen Schema hepatozytenartige Zellen, sog. Neohepatozyten, generiert werden. Das Verfahren wurde so

umgesetzt wie von Ruhnke beschrieben (Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b). Ausgangsmaterial für diese Zellen waren Blutfraktionen, sogenannte Buffycoats, die von der Blutbank Leipzig bezogen wurden. Durch Dichtegradientenzentrifugation wurden wie in Punkt 3.1.1 beschrieben die mononukleären Zellen separiert und in Kulturflaschen ausgesät. In den ersten 6 Tagen wurden die Zellen mit einem Dedifferenzierungsmedium mit M-CSF und IL-3 als Wachstumsfaktoren kultiviert und dedifferenziert. Durch diese Dedifferenzierung wurden die Zellen in einen programmierbaren, Stammzell-ähnlichen Zustand überführt und als PCMOs beschrieben. Im Anschluss wurden die Zellen einem Differenzierungsschritt unterzogen. Das hierbei verwendete Medium enthielt FGF-4 als Wachstumsfaktor. Während der Kultivierung mit diesem Medium näherte sich die Morphologie der Neohepatozyten immer mehr der von Primärhepatozyten an. Vor der Transplantation wurden die Zellen geerntet und die Zellsuspension auf eine Konzentration von 750.000 Zellen/100µl Medium eingestellt.

3.2 Markierung der Zellen mit CM-DiI Membranfarbstoff

Um transplantierte Zellen nach der Explantation unter dem Mikroskop zu erkennen, wurden in einigen Versuchen die Zellen vor der Transplantation markiert. Hierzu wurde der Fluoreszenzmembranfarbstoff CM-DiI (*chloromethylbenzamido derivative of octadecylindocarbocyanine, Rot*, Fa. Molecular Probes) verwendet, der mit Fluoreszenzfilter für Cy3 (*Carbocyanin-3, Fluoreszenzfarbstoff rot*; siehe Punkt 3.9.1) detektiert werden kann. Zur Markierung wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit einer Lösung aus CM-DiI und Vollmedium für 30 min inkubiert. Dabei wurde der Farbstoff in die Zellmembranen integriert. Übriger Farbstoff wurde in zwei Waschschritten mit PBS (*phosphate buffered saline*) entfernt.

3.3 Transplantation der Stamm- und Vorläuferzellen

3.3.1 Versuchstiere

Um eine höhere Toleranz der xenogenen Transplantate zu erzielen, wurden zur Transplantation Mäuse mit einem angeborenen Immundefekt eingesetzt. Bei einem Teil der Mäuse handelte es sich um männliche NOD/SCID-Mäuse. Das Alter der Mäuse lag zwischen

10 und 14 Wochen. Die Versuchstiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und vom *Medizinisch Experimentellen Zentrum* der Universität Leipzig bezogen. Bis zum Tag der Operation wurden die Tiere unter SPF-Bedingungen (*specific pathogen free*) gehalten. In der Zeit von Transplantation bis Explantation wurden die Tiere in einem separaten, klimatisierten Tierstall mit künstlichem Tag-/Nachtwechsel gehalten. Für alle Tierexperimente lag eine Tierversuchsgenehmigung vor.

3.3.2 Transplantation ins Leberparenchym

Vor der Transplantation wurden die Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion von Ketamin und Xylazin anästhesiert. Die Maus wurde in Rückenlage mit Klebestreifen auf einem Metallgestell fixiert und im Abdominalbereich rasiert und desinfiziert. Die Bauchhöhle wurde knapp unterhalb des Sternums mit einem Querschnitt eröffnet. Durch leichten, nach kranial gerichteten Druck auf das Abdomen verlagerte sich der linke Leberlappen nach extraperitoneal und war so zur Injektion zugänglich. Die Zellen wurden über 30-60s direkt in das Parenchym des linken Leberlappens appliziert und dieser dann wieder ins Abdomen replaziert. Im Anschluss wurden Peritoneum und Cutis jeweils mit einer Naht verschlossen und die Maus zum Aufwachen in einen separaten Käfig gelegt.

3.3.3 Transplantation in die Pfortader

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Neohepatozyten in die Pfortader appliziert. Hierzu wurden die Mäuse wie beschrieben anästhesiert und vorbereitet. Die Bauchhöhle wurde mit einem Längsschnitt eröffnet und der Darm seitlich aus der Bauchhöhle verlagert. Die Zellen konnten nach Freilegung der Pfortader so direkt intraportal injiziert werden. Im Weiteren wurde verfahren wie bei der intraparenchymalen Injektion beschrieben.

3.4 Explantation und Fixierung der Lebern

Die Lebern mit den transplantierten Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach 21 d explantiert. Dazu wurde die Maus mittels Genickbruch getötet, die Bauchhöhle eröffnet und die Leber am Leberhilus abgetrennt. Anschließend wurde die Leber für unterschiedliche

Untersuchungen in zwei Teile geschnitten. Ein Teil wurde für PCR-Untersuchungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Gewebestück, welches mikroskopisch untersucht werden sollte, wurde für 5-7 d in 4% Formalin bei 4°C fixiert. Danach wurden die Gewebeprobe entwässert und in Paraffin eingebettet. Von den erhaltenen Paraffinblöcken wurden mit einem Mikrotom 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Plus Objektträger (Fa. Menzel) aufgezogen. Bei den so behandelten Lebern wurden stets Erythrozyten im Parenchym mitfixiert. Diese erschweren die Interpretation von Ergebnissen, vor allem bei Anwendung von Fluoreszenztechniken. Um die Erythrozyten vor der Fixierung zu entfernen, wurden die Lebern für einige Untersuchungen *in situ* gespült. Hierbei wurde wie folgt verfahren: An den mit einer letalen Dosis Phenobarbital behandelten Mäusen wurde chirurgisch ein Zugang zur Pfortader geschaffen und diese punktiert. Über diesen Zugang wurde die Leber nacheinander mit auf 37°C erwärmtem PBS und 4% Formalin gespült. Danach wurde die Leber entnommen und wie oben beschrieben fixiert.

3.5 Immunhistochemische Färbung auf humanes Albumin

Zum Nachweis einer Differenzierung der transplantierten Zellen in Richtung Hepatozyten wurde humanes Albumin als Differenzierungsmarker gewählt. Dieses leberzellenspezifische Protein sollte immunhistochemisch in den Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Hierzu wurde eine immunhistochemische Färbung zur Detektion von humanem Albumin im Lebergewebe von Mäusen etabliert. Der verwendete Primärantikörper richtete sich spezifisch gegen humanes Albumin. Zur Detektion des Primärantikörpers wurde eine ABC-Methode (*avidin biotin complex*) mit DAB (*Diaminobenzidin*) als Substrat angewendet. Es wurden 5µm Gewebeschnitte auf Superfrost-plus-Objektträgern (Fa. Menzel) angefärbt. Pro Färbegang wurden zwischen 6–12 Objektträger mit jeweils 1-2 aufgezogenen Gewebeschnitten bearbeitet. Zur Kontrolle von Sensitivität und Spezifität wurden in jedem Färbegang Kontrollschnitte mitgefärbt. Als Positivkontrolle diente ein Gewebeschnitt einer humanen Leber, als Negativkontrolle ein Gewebeschnitt einer nicht- oder scheintransplantierten NOD/SCID-Maus. Als Vorlage für das Protokoll der Immunhistochemie diente das Handbuch für immunhistochemische Färbungen (Behnisch *et al.* 2003).

3.5.1 Entparaffinisierung und Hydrierung

Zur Entparaffinisierung wurden die Schnitte für jeweils 5 min in den Xyloersatz Rotihistol (Fa. Carl Roth) getaucht. Anschließend wurden die Schnitte schrittweise hydriert. Hierzu wurden sie für jeweils 5 min in einer absteigenden Alkoholreihe der Konzentrationen 100%, 95%, 90% und 70% Ethanol (Fa. J.T. Baker) getaucht. Abschließend wurden die Schnitte zum Waschen 5 min in TBS (*tris buffered saline*) gegeben. Der zehnfach konzentrierte TBS wurde wie folgt angesetzt: 265 g NaCl (Fa. Carl Roth) plus 60 g Tris (Fa. Carl Roth) auf 5 l Aqua dest. (*Aqua destillata*) aufgefüllt. Von dieser Stammlösung wurde die Bedarfslösung durch Verdünnung mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 hergestellt. In der Gebrauchslösung wurde der pH-Wert durch Titration mit HCl (Fa. Carl Roth) auf 7,4 eingestellt.

3.5.2 Antigendemaskierung

Die Demaskierung der Antigene wurde mittels Citrat-Aufschluss in der Mikrowelle vollzogen. Der verwendete Citrat-Puffer wurde wie folgt angesetzt: 4,2 g Citronensäure (Fa. Carl Roth) auf 200 ml Aqua dest. ergab Stammlösung A. 2,9 g Natriumcitrat (Fa. Carl Roth) auf 1000 ml Aqua dest. ergab Stammlösung B. Die Stammlösungen wurden bei 4°C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde die Gebrauchslösung aus 4,5 ml Stammlösung A und 20,5 ml Stammlösung B und 250 ml Aqua dest. hergestellt. In diesem Puffer wurden die Schnitte in einer Mikrowelle bei 800W für zweimal 7 min zum Sieden gebracht. Nach den ersten 7 min wurde der verdunstete Pufferanteil mit Aqua dest. nachgefüllt. Es folgte die Abkühlung in zwei Schritten, 15 min bei RT (*Raumtemperatur*) und weitere 5 min im Wasserbad.

3.5.3 Blockierung unspezifischer Bindungsstellen und endogener Enzyme

Die Blockierung der endogenen Peroxidase erfolgte für 30 min in einer Lösung aus 7% Wasserstoffperoxid in Methanol. Die Lösung wurde aus 35% Wasserstoffperoxid, rein (Fa. Carl Roth) und Methanol (Fa. J.T. Baker) im Mischverhältnis 1:5 angesetzt. Auf diesen Blockierungsschritt folgte dreimaliges Waschen der Schnitte in TBS für jeweils 5 min. Um Reagenzien zu sparen, wurden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift

(DakoCytomationPen, Fa.Dako) eingekreist. Dabei wurde die Zeit, in der die Schnitte nicht benetzt waren, möglichst gering gehalten, um der Austrocknung vorzubeugen. Zusätzlich wurden die weiteren Arbeitsschritte in einer Feuchtekammer durchgeführt. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit einer 3% Lösung aus BSA (*bovine serum albumine*, Fa. Carl Roth) in TBS geblockt. Auf jeden Schnitt wurden ca. 100 µl 3%igen BSA Lösung blasenfrei pipettiert und für 90 min in der Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurde endogenes Avidin und Biotin mit einem kommerziellen Kit (Avidin-/Biotin-Blocking Kit, Fa. Vectorlabs) geblockt. Die Schnitte wurden nacheinander jeweils 15 min mit der Avidin-Blocking Lösung und der Biotin-Blocking Lösung bei RT inkubiert. Zwischen den Schritten erfolgte kein Waschgang, die Schnitte wurden durch vorsichtiges Abklopfen von der zuvor verwendeten Lösung befreit.

3.5.4 Inkubation mit Primärantikörper gegen Humanalbumin

Als Primärantikörper wurde ein spezifisch gegen humanes Albumin gerichteter polyklonaler Antikörper (α -humanes Albumin, aus Kaninchen, Fa. Abcam) verwendet. Der Antikörper wurde in zwei Schritten (1:100 und 1:10) mit 0,3% BSA in TBS auf 1:1000 verdünnt. Pro Schnitt wurden jeweils ca. 100 µl Lösung pipettiert und für 60 min in der Feuchtekammer bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in TBS gewaschen.

3.5.5 ABC-Methode zur Detektion des Primärantikörpers

Der Primärantikörper wurde mit der ABC-Methode (*avidin biotin complex*) detektiert. Hierbei kommen drei Komponenten zum Einsatz: ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper, der sich gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers richtet, Streptavidin und ein biotinyliertes Enzym. Der Sekundärantikörper bindet an das Fc-Fragment (*crystalline fragment, Struktureinheit des Antikörpers*) des Primärantikörpers. An den gebundenen Sekundärantikörper lagern sich Komplexe aus Streptavidin und biotinyliertem Enzym an (Hsu *et al.* 1981). Streptavidin besitzt vier Bindungsstellen für Biotin. Somit können pro Sekundärantikörper mehrere Enzym-Biotin-Einheiten binden. Diese Komplexbildung entspricht einer Verstärkung des Detektionssignals. Das Enzym überführt im nächsten Schritt ein farbloses Chromogen in ein sichtbares Substrat, welches lokal ausfällt. Zur Durchführung

der ABC-Methode wurde ein kommerzielles Sekundärantikörperkit (Fa. Vectorlabs) verwendet. In diesem enthalten war der Zweitantikörper (α -Kaninchen, aus Ziege), Blocking-Serum (aus Ziege) und die ABC-Lösung bestehend aus den zwei Komponenten Streptavidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase. Als Chromogen wurde DAB (*Diaminobenzidin*, Fa. Dako) verwendet. Dieses wird von der Meerrettichoxidase zu einem braunen Präzipitat umgesetzt.

3.5.6 Inkubation mit Sekundärantikörper

Der Sekundärantikörper wurde entsprechend dem Datenblatt des Kits angesetzt. Zu 2 ml TBS wurden 30 μ l Blocking-Serum und 10 μ l Sekundärantikörper gegeben und anschließend in einem 15 ml Flacon für 5 s gevortext. Die Schnitte wurden für 30 min bei RT in der Feuchtekammer mit 100 μ l inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5 min in TBS gewaschen.

3.5.7 ABC-Lösung

Entsprechend den Herstellerangaben wurde die ABC-Lösung 30 min vor Gebrauch in einer Verdünnung von 1:20 in TBS angesetzt und 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurden jeweils 100 μ l pro Schnitt pipettiert und 30 min bei RT inkubiert und anschließend drei Mal 5min lang gewaschen.

3.5.8 Inkubation mit Diaminobenzidin

Unmittelbar vor Gebrauch wurde DAB aus einem kommerziellen Kit (Fa. Dako) angesetzt. Zu 2 ml des im Kit enthaltenen Puffers wurden 2 Tropfen (ca. 40 μ l) DAB-Lösung gegeben. Nach 10 s Vortexen wurde die Lösung bis zum Gebrauch lichtgeschützt gelagert. Pro Schnitt wurden 100 μ l pipettiert und bei RT 5 min in der Feuchtekammer inkubiert. Um ein gleichmäßiges Färbeergebnis zu erhalten, wurde in diesem Schritt besonders auf zügiges Arbeiten und die genaue Einhaltung der Inkubationszeit geachtet. Im Anschluss wurden die Schnitte 10 min unter fließendem, handwarmem Wasser gewaschen.

3.5.9 Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun

Zur Darstellung der Gewebestruktur und der Zellkerne wurden die Schnitte mit Mayers Hämalaun (Fa. Merck) gegengefärbt. Die vom Hersteller gelieferte Stammlösung wurde im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und vor Gebrauch mit einem Faltenfilter filtriert. Die Schnitte wurden für 90 s gefärbt und dabei vorsichtig in der Färbeküvette geschwenkt. Im Anschluss wurden sie 10 min unter fließendem, handwarmem Wasser gewaschen.

3.5.10 Dehydrieren und Eindecken

Über eine aufsteigende Ethanolreihe (30%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% für jeweils 10 s) wurden die Schnitte dehydriert und dreimal für jeweils 30 s in Rotihistol (Fa. Carl Roth) geschwenkt. Anschließend wurden die nicht mit Schnitten belegten Teile der Objektträger mit staubfreien Papiertüchern gereinigt und mit Entellan (Entellan mit Toluol, Fa. Merck) eingedeckt. Die eingedeckten Schnitte wurden 10 h bei RT getrocknet.

3.6 *In situ* Hybridisierung

Zur Identifikation des humanen bzw. murinen Ursprunges von Zellen in transplantiertem Lebergewebe wurden einige Schnitte mit der ISH (*in situ* Hybridisierung) untersucht. Hierbei wurden spezifische Gensonden zum Nachweis menschlicher bzw. muriner DNS (*Desoxyribonukleinsäure*) eingesetzt. Zum Nachweis humaner DNS wurde eine kommerzielle Sonde gegen Alu-Sequenzen (*repetitive, für Primaten spezifische DNS-Sequenz*) verwendet (Alu-Sonde, FITC (*Fluoresceinisothiocyanat*) markiert, Fa. Biogenex). Die Gensonde zum Nachweis muriner DNS bindet an sog. MMS-DNS (*mouse major satellite*). Dies sind hochrepetitive, spezifische Sequenzen des murinen Genoms (Liu *et al.* 2007). Die Sonde wurde wie unter 3.10 beschrieben hergestellt. Zur methodischen Kontrolle wurden in jedem Färbegang ein Schnitt einer humanen Leber (Positivkontrolle) und der einer scheintransplantierten NOD/SCID-Maus (Negativkontrolle) mitbearbeitet. Als Vorlage zur Durchführung der ISH wurde sich an der Methodik von Brüstle *et al.* (Brüstle *et al.* 1995; Brüstle *et al.* 1997) orientiert.

3.6.1 Dehydrierung und Antigendemaskierung

Korrespondierend zur Immunhistochemie auf humanes Albumin wurden die Schnitte in Rotihistol entparaffinisiert (siehe Punkt 3.5.1), durch eine absteigende Alkoholreihe dehydriert und abschließend einmal 5 min in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung wie in Punkt 3.5.2 beschrieben. Der bei der ISH verwendete Aufschlusspuffer unterschied sich von dem der Immunhistologie und wurde wie folgt angesetzt. 3,6 g Natriumcitrat (Fa. Carl Roth) wurden auf 800 ml Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert dieser Lösung wurde unter ständiger Kontrolle mit dem pH-Meter (Lab 860, Fa. Schott) mit NaOH (Fa. Carl Roth) auf 6,0 eingestellt. Anschließend wurde das Volumen mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt, so dass der pH-Wert auf 7,4 stieg. Der Puffer wurde bei 4°C gelagert und 30 min vor Gebrauch aus dem Kühlschrank genommen. Im Weiteren wurde die Antigendemaskierung und Abkühlung der Schnitte so durchgeführt wie bei der immunhistologischen Färbung beschrieben. Nach der Abkühlung wurden die Schnitte für jeweils 30 s in eine aufsteigende Alkoholreihe getaucht. Beginnend bei 30% Ethanol wurden die Schnitte über 70%, 80%, 90% bis zu 95% dehydriert und dann für 15 min an der Luft getrocknet.

3.6.2 Sondenvorbereitung, Denaturierung und Hybridisierung

Die kommerzielle Alu-Sonde (Alu-Sonde, FITC markiert, Fa. Biogenex) lag in Hybridisierungspuffer gelöst vor. 30 min vor Gebrauch wurde die Alu-Sonde aus dem Kühlschrank genommen, die MMS-Sonde wurde aus dem -20°C Gefrierfach langsam auf Eis aufgetaut. Zu dieser Lösung wurde im Verhältnis 1:8 die gereinigte MMS-Sonde zupipettiert und durch Vortexen gemischt. Pro Schnitt wurden nun 15-20 µl Sonden-Mix pipettiert und durch Vortexen gemischt. Pro Schnitt wurden nun 15-20 µl Sonden-Mix pipettiert und mit einem 18x18 mm Deckglas so bedeckt, dass zwischen Glas und Schnitt ein Flüssigkeitsfilm bestehen blieb. Luftblasen wurden durch leichten Druck auf das Deckglas mit einer Pipettenspitze entfernt. Die Ränder des Deckglases wurden auf dem Objektträger mit einem Flüssigklebstoff (Fixogum, Fa. Marabu) versiegelt. Somit waren die Leberschnitte mit Sonden-Mix bedeckt und durch die Versiegelung (Fa. Dako) vor Austrocknung geschützt. Als nächstes wurde der Hybridizer (Fa. Dako) mit Feuchtigkeitsstreifen bestückt und die Objektträger auf die Heizplatte gelegt. Im Hybridizer wurden die Schnitte zuerst für 10 min

bei 95°C denaturiert, über 30 min auf 30°C heruntergekühlt und dann bei dieser Temperatur für 16 h hybridisiert. Nach Abschluss der Hybridisierung wurde der getrocknete Klebstoff mit einer Pinzette entfernt. Die Deckgläser wurden vorsichtig abgenommen

3.6.3 Stringentes Waschen

Der Hybridisierungspuffer wurde durch stringentes Waschen mit SSC (*saline sodium citrate*) entfernt. SSC wurde wie folgt angesetzt: 175 g NaCl (Fa. Carl Roth) und 86 g Natriumcitrat (Fa. Carl Roth) wurden auf 1 l Aqua dest. aufgefüllt und der pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt. Dies ergab die 20fach konzentrierte Stammlösung, die je nach Bedarf verdünnt wurde. Zusätzlich wurde eine 10% Stammlösung des Tensids SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Fa. Carl Roth) angesetzt. Im ersten Waschschrift wurden die Objektträger für 5 min in 2 x SSC mit 0,1% SDS bei RT gewaschen. Der zweite Waschschrift erfolgte in 0,1 x SSC für 10 min bei 44°C im Wasserbad. Danach wurde zwei Mal für 5 min in 2 x SSC mit 0,1% SDS bei RT gewaschen.

3.6.4 Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Entsprechend dem Vorgehen bei der IHC wurden die Schnitte nach dem letzten Waschschrift mit einem Fettstift eingekreist und für 90 min mit 3% BSA-Lösung bei RT in der Feuchtekammer zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Analog zur IHC folgte der Avidin/Biotin Block.

3.6.5 Detektion der Sonden

Die Detektion der im Schnitt gebundenen Sonden wurde mittels Fluorochrom-markiertem zweiten Antikörper durchgeführt. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Cy2 (*Carbocyanin-2, grün*) und Cy3 (*Carbocyanin-3, rot*) verwendet. Das mit der Alu-Sonde konjugierte Fluorescein wurde an einen mehrfach biotinylierten α -Fluorescein Antikörper gebunden. An diesen konnten mehrere Cy2 markierte Streptavidin Proteine binden. Hierdurch wurde das Detektionssignal verstärkt und die Sensitivität erhöht. Das mit der MMS-Sonde assoziierte

DIG (*Digoxigenin*) wurde direkt mit einem Cy3 markierten Antikörper detektiert. Zur Verdünnung wurde für alle Antikörper 0,3% BSA in TBS mit 0,1% Tween20 (Fa. Sigma) verwendet. Alle Arbeitsschritte ab dem Einsatz des ersten Farbstoffes wurden lichtgeschützt durchgeführt, um einem Ausbleichen der Farbstoffe vorzubeugen. Die Waschgänge wurden ebenfalls lichtgeschützt jeweils dreimal für 5 min in TBS durchgeführt. Nach dem Avidin/Biotin Block wurde der Fluorescein-Antikörper (α -Flourescein, aus Ziege, Fa. Vectorlabs) in einer Verdünnung von 1:100 auf die Schnitte pipettiert. Die Inkubation erfolgte für 60 min bei RT in der Feuchteammer. Nach der Inkubation wurden die Schnitte gewaschen. Es folgten die Inkubation mit Streptavidin-Cy2 (Fa. Dianova) in einer Verdünnung von 1:100 für 60 min und ein weiterer Waschgang. Im Anschluss wurde die MMS-Sonde detektiert. Hierzu wurden die Schnitte mit einem Cy3 markierten Anti-DIG-Antikörper (Fa. Dianova) in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach gewaschen.

3.6.6 Kernfärbung mit DAPI

Um die Cy2 und Cy3 Signale unter dem Mikroskop auf die Zellkerne zuordnen zu können wurde eine Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (*4',6 Diamidino-2-Phenylindol, blau*, Fa. Molecular Probes) vorgenommen. Hierzu wurde eine Gebrauchslösung von 2,3 $\mu\text{g/ml}$ aus der gelieferten Stammlösung angesetzt. Die Schnitte wurden lichtgeschützt für 5 min inkubiert. Es folgten zwei Waschgänge über jeweils 5 min in TBS und ein Waschgang über 5 min in Aqua dest.

3.6.7 Eindecken der Proben

Die *in situ* hybridisierten Proben wurden in der wässrigen Phase eingedeckt. Hierbei wurde Eindeckmedium Mowiol verwendet. Zur Herstellung des Mowiols wurde eine Lösung aus 6 g Glycerol (Fa. Merck), 2,4 g Mowiol 4-88 (Fa. Sigma-Aldrich), 12 ml TBS und 6 ml Aqua dest. für 4 h bei RT mit dem Magnetrührer gerührt. Danach wurde die Lösung 2 h ohne Rühren bei RT stehen gelassen und dann im Wasserbad (50°C) für 10 min erwärmt. Im Anschluss wurde die Lösung für 15 min bei 2800 G zentrifugiert, der Überstand mit der Pipette abgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Die Aliquots wurden bei

-20°C gelagert und vor Gebrauch bei max. 50°C im Heizblock verflüssigt. Mit dem flüssigen Mowiol und Deckgläschen geeigneter Größe wurden die Schnitte blasenfrei eingedeckt. Im Anschluss wurden die eingedeckten Objektträger für mind. 10 h bei RT getrocknet.

3.7 Kombination von *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie

Um den genetischen Ursprung Humanalbumin-positiver Zellen zu bestimmen, wurden einige Schnitte mit einer Kombination aus ISH und IHC untersucht. Dazu wurden die Schnitte hydriert und wie für die ISH demaskiert und wieder dehydriert. Hybridisiert wurde in diesem Verfahren meist nur mit der Alu-Sonde, die Denaturierungs- und Hybridisierungszeiten wurden wie bei der einfachen ISH gewählt. Nach dem stringenten Waschen erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase und der unspezifischen Bindungsstellen mit 3% BSA in TBS und dem Avidin/Biotin Blocking Kit. Als nächstes wurden die Schnitte mit dem Antikörper gegen humanes Albumin inkubiert und dieser wie in Punkt 3.5.5 beschrieben mit der ABC-Methode detektiert. Auf eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun wurde zur meist verzichtet um Auslöschungsphänomene der Fluoreszenzsignale zu vermeiden. Es folgte die Detektion der Alu-Sonde wie beschrieben mit einem biotinylierten α -Fluorescein-Antikörper und Cy2 markiertem Streptavidin. Im Weiteren wurde eine DAPI-Kernfärbung vorgenommen und die Schnitte mit Mowiol eingedeckt.

3.8 Histologische Standardfärbungen

3.8.1 Eisennachweis mit der Berliner Blau Reaktion

In transplantiertem Gewebe wurde Eisen durch die Berliner Blau Reaktion nachgewiesen. Entparaffinisierung und Hydrierung wurden analog zur IHC durchgeführt. Vor Gebrauch wurde eine Lösung aus 2% Kaliumhexacyanoferrat II (Fa. Carl Roth) in 2% HCl (Fa. Carl Roth) angesetzt. In dieser Lösung wurden die Schnitte für 20 min bei RT gefärbt. Zur besseren Darstellung des Lebergewebes wurden die Schnitte in einer Kernechtrolösung (Fa. Carl Roth) gegengefärbt. Im Anschluss wurde zweimal in Aqua dest. für jeweils 5 min

gewaschen. Die Schnitte wurden dann wie bei der IHC beschrieben entwässert und mit Entellan eingedeckt.

3.8.2 PAS-Färbung

Glykogen wird u.a. in Leberzellen gespeichert. Zum Nachweis von Glykogen in transplantiertem Lebergewebe wurden einige Schnitte mit der PAS-Färbung (*periodic acid-Schiff stain*) untersucht. Hierzu wurden drei Lösungen verwendet: die Oxidationslösung, die Reduktionslösung und das Schiff'sche Reagenz. Die Oxidationslösung wurde wie folgt angesetzt: 1 g Perjodsäure (Fa.Carl Roth) wurde in 20 ml 0,1 M Natriumacetat (Fa.Carl Roth) gelöst und mit 70 ml Ethanol (Fa. J.T.Baker) und 10 ml Aqua dest. aufgefüllt. Zur Herstellung der Reduktionslösung wurden 2 g Kaliumjodid (Fa.Carl Roth) mit 2 g Natriumthiosulfat (Fa.Carl Roth) in 40 ml Aqua dest. gelöst und mit 60 ml Ethanol aufgefüllt. Desweiteren wurden 2 ml 1M HCl (Fa.Carl Roth) zugegeben. Oxidations- und Reduktionslösung wurden beide bei RT lichtgeschützt gelagert und maximal eine Woche verwendet. Das Schiff'sche Reagenz bestand aus zwei Komponenten: Für Lösung A wurde 1 g basisches Fuchsin (Fa.Carl Roth) in 30 ml 1 M HCl gelöst. Für Lösung B wurde 1 g Kaliumdisulfit (Fa.Carl Roth) in 170 ml Aqua dest. gelöst. Zum Ansetzen der Gebrauchslösung wurden 30 ml der Lösung A mit 170 ml der Lösung B gemischt, für 24 h stehen gelassen und anschließend mit 600 g Aktivkohle (Fa.Carl Roth) versetzt. Nach zweimaliger Filtration mit einem Faltenfilter wurde das Schiff'sche Reagenz kühl gelagert und für einige Wochen verwendet. Zur Färbung wurden die Schnitte wie bei der IHC beschrieben entparaffinisiert und hydriert. Nun wurden die Schnitte für 10 min in Oxidationslösung gegeben und danach zwei Mal für 5 min in Ethanol 70% gewaschen. Es folgte ein Bad in der Reduktionslösung für 1 min und zwei Waschgänge in Ethanol 70%. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in das Schiff'sche Reagenz gegeben und darauf für 10 min unter fließendem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun und das Eindecken der Schnitte wurde analog zur IHC durchgeführt.

3.9 Mikroskopie

3.9.1 Mikroskop und Kamera

Die Färbeergebnisse wurden mit einem BX41 Mikroskop mit Fluoreszenzeinrichtung (Fa. Olympus) ausgewertet. Im Filterblock konnte zwischen Filtern für Cy2 (U-MINI BA-2, Fa. Olympus), Cy3 (U-MNG2, Fa. Olympus) und für DAPI (U-MWU2, Fa. Olympus) gewählt werden. Zur Dokumentation wurde eine ColorViewII-Kamera verwendet, die aufgenommenen Bilder wurden mit Programm analySIS B (Fa. Soft Imaging System) archiviert.

3.9.2 Methodik des Mikroskopierens

Um systematisch alle positiven Färbeergebnisse zu erfassen, wurden die Schnitte in einer 20fachen Vergrößerung s-förmig von oben nach unten durchgesehen. Von positiven Strukturen wurde je ein Bild mit einem Cy2-Filter, mit einem Cy3-Filter und mit dem UV-Filter (*ultra violett*) angefertigt. Im Weiteren wurde mit analySIS B ein Fusionsbild (Overlay) erzeugt, in dem alle drei Farbkanäle in einem Bild zu sehen sind. Sowohl die Bilder der einzelnen Farbkanäle als auch das Overlay wurden in einer Datenbank gespeichert.

3.10 Herstellung der Mouse-Major-Satellite-Sonde

Zum Nachweis des genetischen Ursprungs von Zellkernen wurde wie in Punkt 3.6 beschrieben die Methode der *in situ* Hybridisierung angewendet. Die Detektion muriner Zellkerne erfolgte durch eine DIG markierte DNS-Sonde. Zur Herstellung dieser wurde ein für das murine Genom spezifischer DNS-Abschnitt (siehe Abbildung 1), der mouse major satellite, mittels PCR amplifiziert. Kopien dieses DNS-Abschnittes wurden in einem weiteren PCR-Schritt mit DIG konjugiert.

```

5´ggacctggaatatggcgagaaaactgaaaatcacgaaaatgagaatacacactttaggacgtgaaatatggcgagggaaa
ctgaaaaaggtggaaaattgaaatgtccactgtaggacgtggaatatggcaagaaaactgaaaatcatggaaaatgagaacat
ccactgacgactgaaaatgacgaaatcactaaaaaacgtgaaaaatgagaatgcactgaa3´
    
```

Abbildung 1: DNS-Sequenz des mouse major satellite. Unterstrichen sind die Ansatzregionen des Forward Primers am 5´-Ende und des Reverse Primers am 3´-Ende.

3.10.1 Maus-DNS und Primer

Ausgangsmaterial zur Herstellung der MMS stellte DNS aus Mauslebern von Black6 Mäusen dar. Die DNS wurde freundlicherweise von Frau Dr. Wiebke Schormann aus der Arbeitsgruppe Hengstler isoliert. Dazu wurde das Genomic-DNA-Purification-Kit (Fa. Genra Systems, Minneapolis, USA) verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der gewonnenen DNS photometrisch ermittelt. Aus der gewonnenen DNS sollte die Sequenz amplifiziert werden, die nach Brüstle (Brüstle *et al.* 1995; Brüstle *et al.* 1997) für den MMS (*mouse major satellite*) kodiert (siehe Abbildung 1). Zur Amplifikation dieses DNS-Abschnittes aus dem Mausgenom waren zwei Primer nötig. Ein Forward Primer, der am komplementären DNS-Strang ansetzt, und ein Reverse Primer, der am abgebildeten DNS-Strang ansetzt. Die Primer mit den folgenden Sequenzen:

- Primer Forward: 5´-gac ctg gaa tat ggc gag aa-3´
- Primer Reverse: 5´-cgc ttc agt gtg cat ttc tc-3´

wurden bei der Firma Biomers, Ulm erworben, die gelieferte Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. (Konzentration von 10pM/µl) verdünnt, aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.10.2 Gelelektrophorese

Bei der Herstellung der MMS-Sonde wurden in einigen Schritten spezifische DNS-Abschnitte aus der Lösung mit anderen DNS-Abschnitten isoliert, um sie zu quantifizieren oder weiter zu bearbeiten. Hierzu wurde die Methode der Gelelektrophorese gewählt, bei der DNS-Abschnitte abhängig von ihrer Länge in einem Agarose-Gel verteilt werden. Bei Kenntnis der Länge des spezifischen DNS-Abschnittes kann dieser unter UV-Licht als eine Bande im

Agarose-Gel erkannt werden. Das Agarose-Gel wurde aus 3 g Agarose (Fa. Carl Roth) und 150 ml TBE (*Tris Borat Ethylendiamintetraacetat*) hergestellt. Der einfach konzentrierte TBE-Puffer wurde mit 10,8 g Tris (Fa. Carl Roth), 5,6 g Borsäure (Fa. Carl Roth) und 0,94 g EDTA (*Ethylendiamintetraacetat*, Fa. Carl Roth) auf 1 l Aqua dest. angesetzt. Die Agarose wurde im TBE-Puffer mehrfach in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht, bis beim Schwenken keine Schlieren mehr sichtbar waren. Nach 2 min Abkühlung bei RT wurden der Lösung 12 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Fa. Invitrogen) zugegeben und gleichmäßig verteilt. Je 50 ml dieser Lösung wurden blasenfrei in eine Gelkammer mit zwei Probekämmen gegeben. Die abgekühlten Gele wurden in Frischhaltefolie bei 4°C gelagert und möglichst zeitnah verwendet. Hierzu wurden sie in die Elektrophorese-Aparatur (Fa. Renner) gelegt und mit TBE-Puffer vollständig bedeckt. Anschließend wurden die Probekämme vorsichtig entnommen. Die Proben wurden in einem sterilen Eppendorf-Gefäß vorbereitet. 1 µl Loading Dye 6x (Fa. Sigma) diente als Probenpuffer, zu dem 1 µl des PCR-Produktes und 4 µl Aqua dest gegeben wurden. Dieser Ansatz wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt und dann in eine Probentasche pipettiert. In die linke Probentasche jeder Kammreihe wurde zur Eichung eine Leiterprobe mit DNS-Abschnitten bekannter Längen gegeben. Als Leiterprobe wurde 100 bp Ladder (Fa. Sigma) verwendet, die nach Herstellerangaben wie folgt angesetzt wurde. Zu 5 µl Ladder Konzentrat wurden 5 µl Aqua dest. und 2 µl Loading Dye gegeben. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 V für 40-45 min durchgeführt. Danach wurde das Gel unter UV-Anregung (254 nm) mit einer Belichtungszeit von 20-25 s mit einem Gel-Dokumentationssystem (Fa. Intas) aufgenommen und ein Papierabzug der Aufnahme ausgedruckt.

3.10.3 PCR zur Herstellung der MMS-Sequenz

Mit einer ersten PCR (PCR I) wurde ausgehend von der isolierten Maus-DNS der MMS-DNS-Abschnitt amplifiziert. Hierzu wurde bei RT der in Tabelle 1 beschriebene Ansatz in ein steriles Eppendorf-Gefäß pipettiert. Die dNTPs (*Desoxyribonukleosidtriphosphate*) und der 10 x PCR-Puffer wurden von der Firma Roche erworben. Das Template sowie die Taq-Polymerase (*hitzestabile DNA-Polymerase des Bakteriums Thermus aquaticus*) wurden unmittelbar vor dem Start der PCR aufgetaut und dem Ansatz auf Eis zupipettiert. Zur PCR wurde ein Thermocycler (Fa. Biometra) verwendet. Die Temperaturenabfolge wurde wie folgt

eingestellt: 94°C für 4 min 20 s, 48°C für 30 s dann 72°C für 7 min 20 s. Mit diesen Einstellungen wurden 25 Zyklen gefahren. Nach Abschluss der PCR wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis dokumentiert.

Tabelle 1: Pipettierschema für PCR I zur Amplifikation der mouse major satellite Sequenz aus Maus-DNS

Komponenten des Ansatzes	Menge in μl
Aqua dest.	20,5 μl
10 x PCR-Puffer	2,5 μl
dNTPs	0,5 μl
Primer Forward 1:10	0,5 μl
Primer Reverse 1:10	0,5 μl
Template	0,5 μl
Taq-Polymerase	0,5 μl

3.10.4 Gel-Extraktion des PCR-Produktes

Nach der Auftrennung mittels Gelelektrophorese lag das PCR-Produkt aus PCR I konzentriert in einer Bande des Agarose-Gels vor. Um die DNS-Sequenzen als Template für eine weitere PCR zu nutzen, wurden sie aus dem Gel extrahiert. Dazu wurde ein kommerzielles Gel-Extraction Kit (Fa. Qiagen) verwendet. Die Lokalisation der Bande im Gel wurde unter UV-Bestrahlung durch zwei Schnitte mit einem Skalpell markiert. Dabei wurde ein UV-Schutz für die Augen getragen. Der markierte Bereich wurde aus dem Gel geschnitten, gewogen und in ein 50 ml Falcon-Gefäß gegeben. Nach Herstellerangaben wurden dem Gelstück die dreifache Menge des Puffers QG (100 mg~100 μl) aus dem Kit zugegeben und dann im Wasserbad bei 50°C für 10 min inkubiert. Dabei wurden die Falcon-Gefäße alle 2-3 min gevortext, so dass das Gel nach der Inkubation vollständig im Puffer aufgelöst war. Zu dieser Lösung wurde die einfache Menge des ursprünglichen Gels (100 mg = 100 μl) an Isopropanol aus dem Kit zugegeben und anschließend gevortext. Die im Kit enthaltenen Filtersäulen (QIAquick spin columns) wurden auf 2 ml Eppendorf-Gefäße aufgesetzt und mit max. 800 μl des gelösten Gels befüllt. Die befüllten Filtersäulen wurden nun für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Minispin, Fa. Eppendorf). Dabei wurde die gelöste DNS in den Filtersäulen gebunden, der Rest der Lösung wurde im Eppendorf-Gefäß gesammelt und anschließend

verworfen. Zum Waschen wurden die Säulen nun mit 800 µl PE-Puffer aus dem Kit befüllt und erneut 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Puffer im Eppendorf-Gefäß wurde verworfen. Es folgte eine weitere Zentrifugation, ohne Puffer nachzufüllen. Um die DNS aus der Filtersäule zu lösen, wurde diese auf ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aufgesetzt. 50 µl Aqua dest. wurden in die Mitte des Filters pipettiert. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde die Säule nun 1 min inkubiert und dann bei 20.000 rpm 1 min zentrifugiert. Nach diesem Schritt befand sich die extrahierte DNS in wässriger Lösung im Eppendorf-Gefäß. Die DNS wurde bei -20°C gelagert oder gleich im Anschluss in einer weiteren PCR als Template verwendet.

3.10.5 PCR zur Herstellung der DIG-markierten Sonde

In einer zweiten PCR (PCR II) wurde die DIG-markierte MMS-Sonde hergestellt. Template für diese PCR war die in PCR I vervielfältigte MMS-Sequenz. Als Substrat für die Taq-Polymerase wurden kommerzielle DIG konjugierte dNTPs eingesetzt (DIG-dNTPs, Fa. Roche). Als Primer wurden die gleichen DNS-Sequenzen wie in PCR I verwendet. Der Ansatz wurde auf die gleiche Weise wie in PCR I pipettiert. Die pipettierten Volumina sind in Tabelle 2 beschrieben. Die Temperaturabfolge wurde identisch zu PCR I gewählt. Es wurden ebenfalls 25 Zyklen gefahren. Nach Abschluss der PCR wurde das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis dokumentiert. Die Banden mit der DIG-markierten MMS Sonde wurden markiert und wie in Punkt 3.10.4 beschrieben aus dem Agarose-Gel extrahiert. Die so erhaltene MMS-Sonde wurde bei -20°C gelagert und wie beschrieben zur ISH eingesetzt.

Tabelle 2: Pipettierschema für PCR II zur DIG-Markierung der mouse major satellite DNS

Komponenten des Ansatzes	Menge in µl
Aqua dest.	19,25 µl
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
DIG-dNTPs	2,5 µl
Primer Forward 1:10	0,125 µl
Primer Reverse 1:10	0,125 µl
Template	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl

4 Ergebnisse

4.1 Identifikation der transplantierten Zellen

Voraussetzung für die mikroskopische Auswertung der durchgeführten Studien war, die Identifikation der transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen in histologischen Schnitten der Mauslebern. Dazu wurden die Zellen vor der Transplantation mit dem Membranfarbstoff CM-DiI (*chloromethylbenzamido derivative of octadecylindocarbocyanine, Membranfarbstoff, rot*) markiert. Zusätzlich wurden die Zellen mittels ISH (*in situ* Hybridisierung) identifiziert.

4.1.1 CM-DiI-markierte Zellen

Zur Markierung mit dem Fluoreszenzmembranfarbstoff CM-DiI wurden Nabelschnurstammzellen und *in vitro* vordifferenzierte Neohepatozyten vor der Transplantation in einem CM-DiI-haltigen Medium inkubiert. Anschließend wurden je 750.000 Zellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen injiziert. Die Lebern wurden nach einem definierten Zeitraum, meist 21 d, explantiert. Wie in Abbildung 2 zu sehen waren in Paraffinschnitten der explantierten Lebern bei Anregung mit fluoreszierendem Licht im Cy3-Kanal (*Carbocyanin-3*) CM-DiI-positive, rot fluoreszierende Zellen zu sehen. Gefunden wurden einzelne Zellen im Gewebe oder in Gefäßen und größere, rot fluoreszierende Areale, in denen mehrere markierte Zellen dicht zusammen lagen. Die Kernbereiche waren jeweils von der Fluoreszenz ausgespart. Die Rot-Fluoreszenz wurde sowohl in den nativen Schnitten als auch in den immunhistochemisch gefärbten und hybridisierten Schnitten beobachtet. Dadurch konnten die CM-DiI markierten Zellen mit den Ergebnissen anderer Nachweismethoden im selben Schnitt kolokalisiert werden. Somit stellte die Markierung mit CM-DiI eine effektive Methode zur Wiedererkennung der transplantierten Zellen in histologischen Schnitten dar. Zur genaueren Charakterisierung CM-DiI-positiver Zellen sollte zusätzlich deren genetischer Ursprung ermittelt werden.

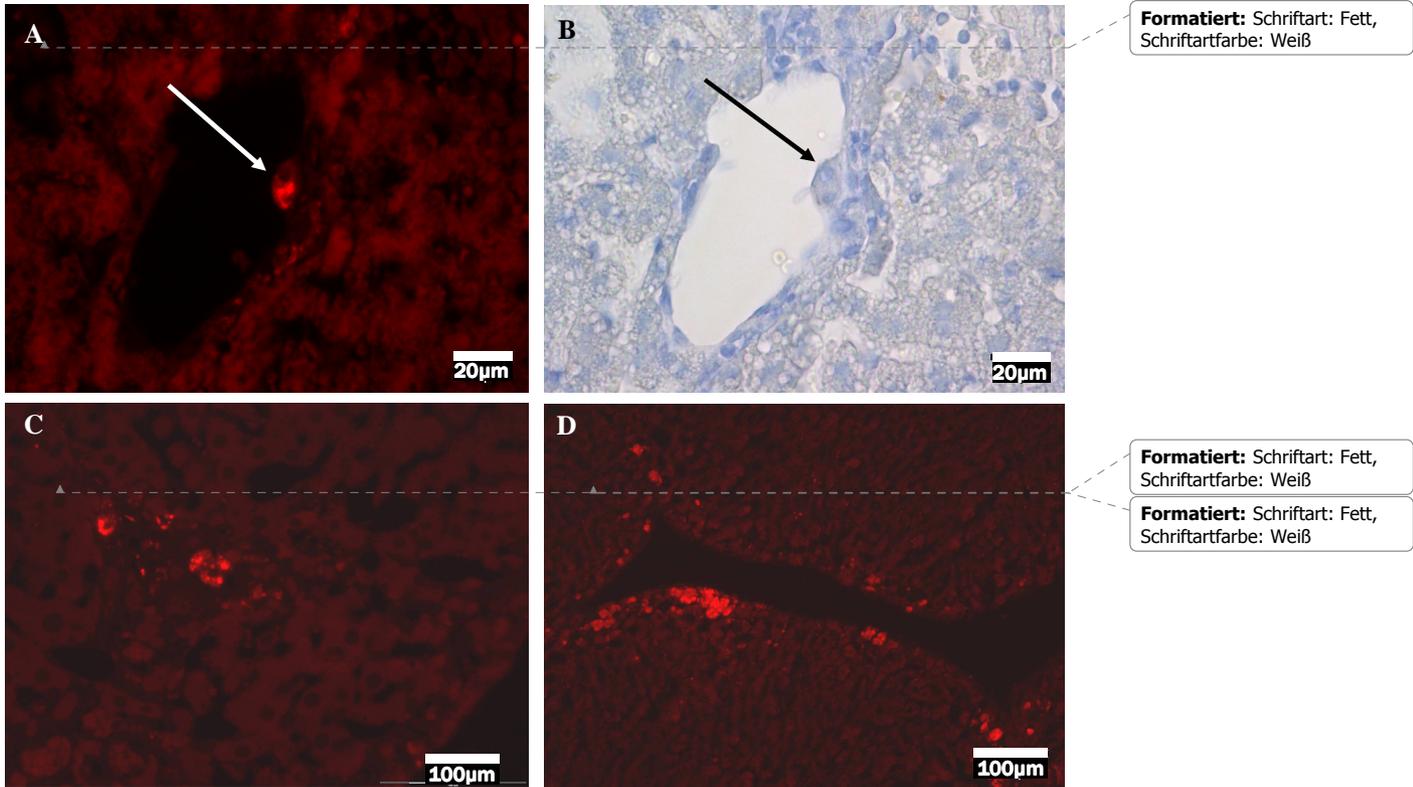


Abbildung 2: CM-DiI-markierte Neohepatozyten 2 d (A,B) und 21 d (C,D) nach Transplantation in Lebern von NOD/SCID-Mäusen. CM-DiI fluoresziert rot. CM-DiI-positive Zellen sind in Konglomeraten gruppiert (C, D) oder liegen einzeln (A, weißer Pfeil). (B) Durchlichtaufnahme nach Gewebefärbung mit Mayer's Hämalaun, wobei sich Zellkerne dunkelblau und Zytoplasma hellblau färben. Die CM-DiI-positive Zelle aus A (weißer Pfeil) am Rand eines Gefäßes wird durch den schwarzen Pfeil markiert.

4.1.2 Genetische Charakterisierung durch *in situ* Hybridisierung

Zur sicheren Identifizierung der transplantierten Zellen wurde zusätzlich der Nachweis von menschlichen Kernen in CM-DiI-positiven Zellen angestrebt. Hierzu wurde die Methode der *in situ* Hybridisierung gewählt. Es wurde eine Gensonde verwendet, die an Alu-Sequenzen (*repetitive, für Primaten spezifische, DNS-Sequenz*) bindet. Dies sind für das Genom von Primaten spezifische hochrepetitive DNS-Sequenzen (*Desoxyribonucleinsäure*) und wurden in diesem Zusammenhang zum sicheren Nachweis menschlicher DNS verwendet. Zusätzlich wurden Mauskerne in einigen Gewebeschnitten mit einer für das murine Genom spezifische MMS-Sonde (*mouse major satellite*) nachgewiesen, die zuvor mittels PCR hergestellt wurde.

Paraffinschnitte von transplantierten Mauslebern wurden mit einer Lösung aus Alu-Sonde und MMS-Sonde in Hybridisierungspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Gensonden immunhistochemisch detektiert. Die Alu-Sonde wurde mit Cy2-markierten Antikörpern (*Carbocyanin-2, grüne Fluoreszenz*) und MMS-Sonde mit Cy3-markierten Antikörpern (*Carbocyanin-3, rote Fluoreszenz*) nachgewiesen. Eine unspezifische Kernfärbung erfolgte mit DAPI (*4',6 Diamidino-2-Phenylindol, blaue Fluoreszenz*). Wie in Abbildung 3 dargestellt konnten durch Aufeinanderlegen der einzelnen Farbkanäle im Fusionsbild (Overlay) die DAPI-Signale mit Alu- bzw. MMS-Signalen kolokalisiert werden. Somit erfolgte der sichere Nachweis von Mensch- bzw. Mauskernen.

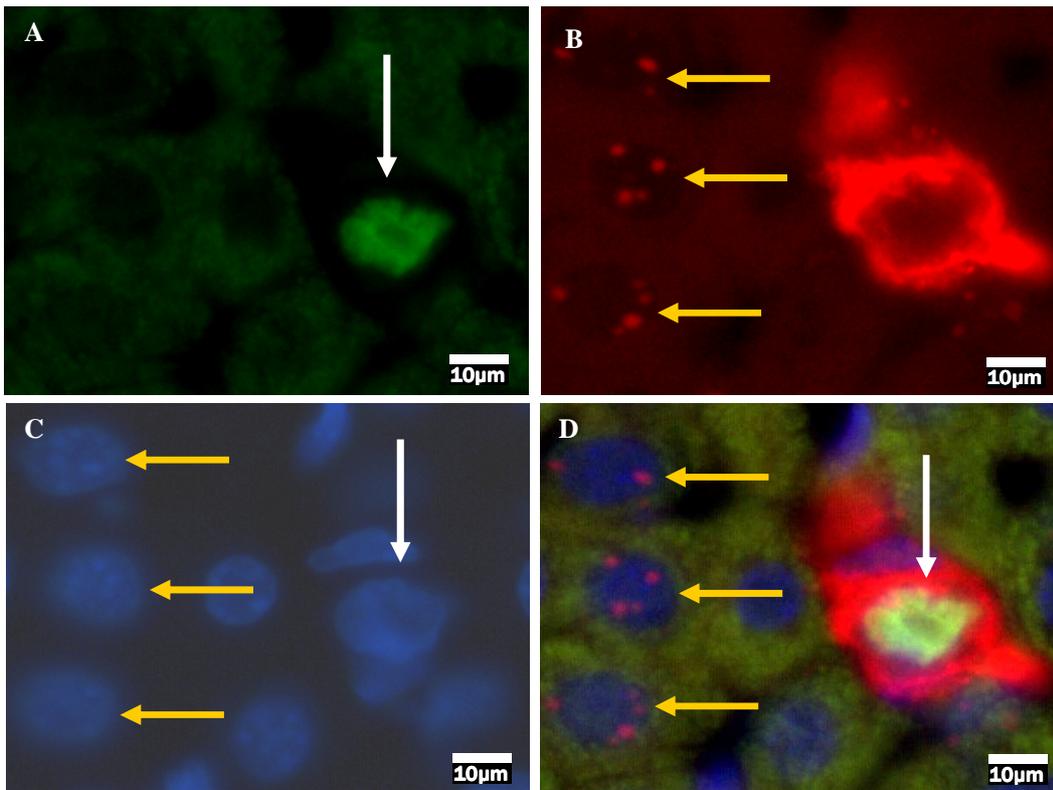


Abbildung 3: (A-D) In situ Hybridisierung mit Alu- und MMS-Sonde 2 d nach Transplantation von CM-DiI markierten Nabelschnurblutzellen in den linken Leberlappen einer NOD/SCID-Maus. (A) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün. Ein Alu-positiver Kern ist mit dem weißen Pfeil gekennzeichnet. (B) Cy3-Kanal, MMS-Sonde ist rot, punktförmig (gelbe Pfeile), CM-DiI ist rot, flächig. (C) DAPI-Kanal, DNS-haltige Kerne sind blau. Der Alu-positive Kern (weißer Pfeil) und die MMS-positiven Kerne (gelbe Pfeile) können einzelnen Kernen im DAPI-Kanal zugeordnet werden. Im Overlay (D) werden die Kanäle zur Deckung gebracht um eine exakte Kolokalisation der ISH-Sonden mit der DAPI-Kernfärbung darzustellen.

4.1.3 Sensitivität und Spezifität der ISH

Mittels ISH wurden die transplantierten Zellen im murinen Lebergewebe detektiert. Zur Untercheidung positiver Fluoreszenzsignale von Färbeartefakten wurde wie folgt verfahren: Die mit Cy2 markierten Alu-Sonden fluoreszieren ausschließlich durch Anregung im Cy2-Kanal. Jede potentiell positive Struktur wurde im Cy2-, im Cy3- und im FITC-Filter separat betrachtet und fotografisch dokumentiert. Es wurden nur solche Strukturen als positiv gewertet, die spezifisch durch den Cy2- bzw. Cy3-Filter zur Fluoreszenz angeregt wurden. Strukturen wie in Abbildung 4, die unspezifisch in allen Farbkanälen fluoreszierten, wurden als Artefakt gewertet.

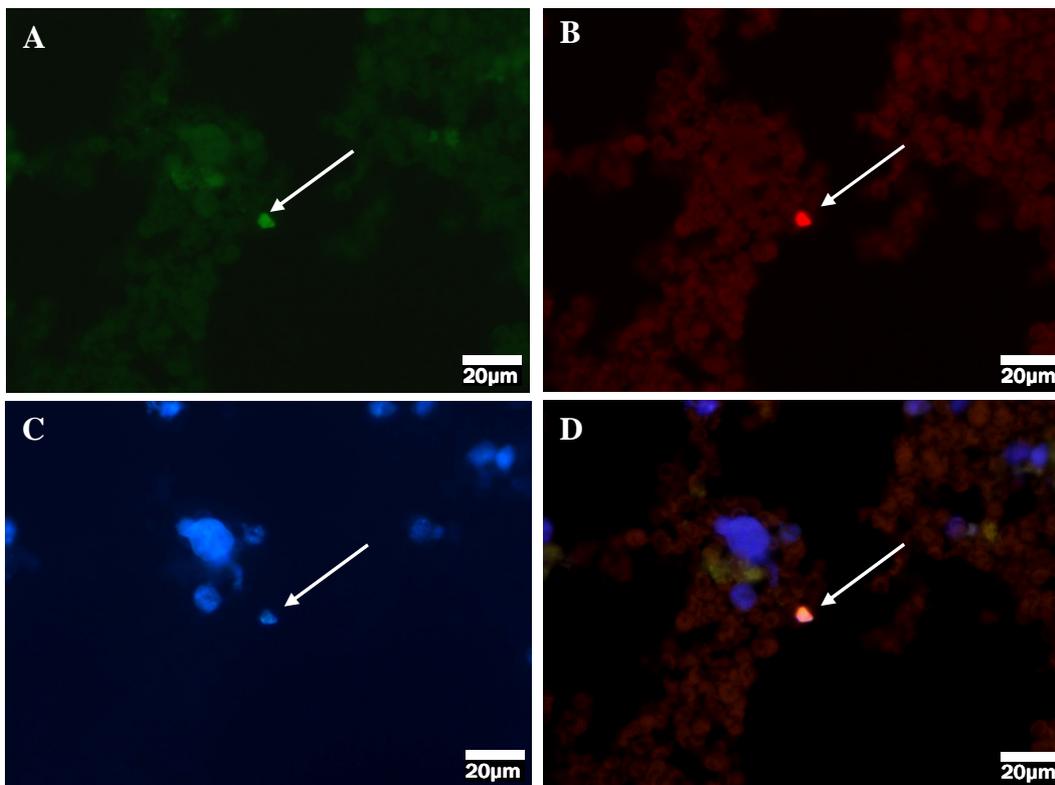


Abbildung 4: (A-D) In situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 2 Tage nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber einer NOD/SCID-Maus. (A) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün. Potenziell Alu-positive, grün fluoreszierende Struktur (weißer Pfeil). (B) Cy3-Kanal, die Struktur fluoresziert ebenfalls im Cy3-Kanal (weißer Pfeil). (C) DAPI-Kanal, DAPI-Kernnachweis ist blau. Die entsprechende Struktur fluoresziert im DAPI-Kanal blau (weißer Pfeil). (D) Overlay aus Cy2-, Cy3-, und DAPI-Kanal. Die entsprechende Struktur (weißer Pfeil) fluoresziert rötlich. Die Struktur fluoresziert unspezifisch in allen Kanälen und wird deshalb als Artefakt gewertet.

Als weitere Kontrolle der Spezifität der ISH wurde an den untersuchten Schnitten stets ein Kernnachweis mit DAPI durchgeführt. Wie in 4.1.2. beschrieben, wurde die Kernlage der Sondensignale im Fusionsbild bestätigt. Sondensignale wurden nur als positiv gewertet, wenn sie im Fusionsbild mit einer Kernstruktur im DAPI-Kanal deckungsgleich kolokalisiert werden konnten. In der ISH sollten menschliche bzw. murine Zellkerne nachgewiesen werden. Zur Sicherstellung der Speziespezifität der Sonden erfolgte in jedem Färbegang eine methodische Kontrolle an humanen Lebern und scheintransplantierten Mausethern. Die Alu-Sonde wurde einzeln oder zusammen mit MMS-Sonde in einem Hybridisierungsansatz verwendet. Abbildung 5 verdeutlicht die Speziespezifität und Sensitivität der Sonden.

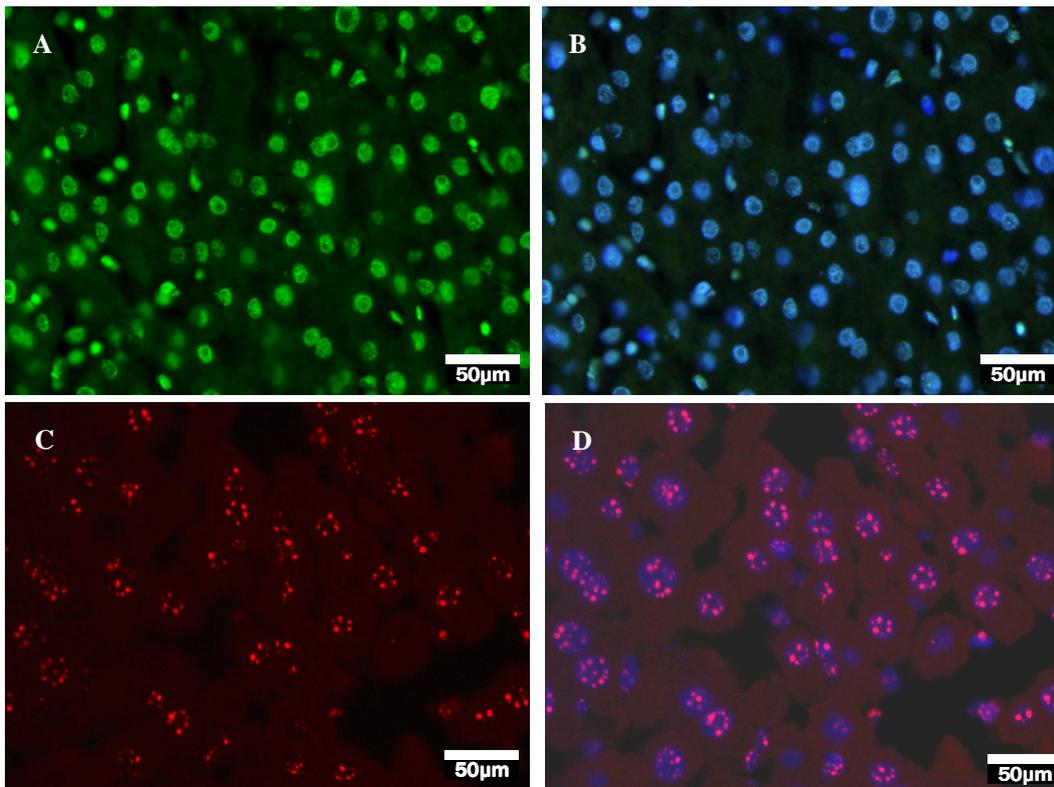


Abbildung 5: In situ Hybridisierung mit Alu- und MMS-Sonde in einem Hybridisierungsansatz an humanen (A, B) und murinen (C, D) Leberschnitten zur methodischen Kontrolle. Die positiven Sondensignale der Alu-Sonde (Cy2, grün, A) und der MMS-Sonde (Cy3, rot, punktförmig, C) wurden im Overlay (B, D) durch Kolokalisation mit DAPI gefärbten Kernen bestätigt und sind für die entsprechende Spezies hochspezifisch.

4.2 Analyse von Neohepatozyten nach unterschiedlicher Verweildauer in Lebern von NOD/SCID-Mäusen

Im folgenden Versuch sollte der Werdegang von Neohepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation in die Leber von NOD/SCID-Mäusen untersucht werden. Im Vorfeld der Studie wurden dazu humane Blutmonozyten *in vitro* zu Neohepatozyten vordifferenziert, mit CM-DiI-markiert und in die Lebern von NOD/SCID-Mäusen transplantiert. Es wurden 750.000 Neohepatozyten pro Maus direkt ins Leberparenchym oder über die Pfortader transplantiert. Die Lebern wurden nach 2 d, 21 d und 60 d explantiert und in Paraffin eingebettet. In histologischen Schnitten wurden mit der ISH humane Zellkerne mit Alu-Sonden nachgewiesen. Die Anzahl der Alu-positiven Strukturen war bei beiden Transplantationsmodi vergleichbar. In einem Teil der Schnitte wurden Mauskerne mit einer MMS-Sonde detektiert. Von jeder explantierten Leber wurden 2-5 Schnitte mit der ISH bearbeitet und ausgewertet. Bei der Analyse sollte bedacht werden, dass die Anzahl der detektierten Alu-positiven Kernen stark von der Position des Schnittes innerhalb der Leber abhängt. Daraus folgt eine starke Variation zwischen den einzelnen Versuchstieren und zwischen verschiedenen Schnitten aus einem Versuchstier. Daher sind die Analysen als semiquantitativ einzustufen und eignen sich nicht für statistische Zwecke. Jedoch eignet sich diese Analyse, um stark ausgeprägte Trends darzustellen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Anzahl der Alu-positiven Kerne in den Lebern von NOD/SCID-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von 750.000 aus mononukleären Zellen vordifferenzierte Neohepatozyten

Entnahme der transplantierten Lebern nach	Versuchstiere pro Gruppe	Anzahl der untersuchten Schnitte	Alu-positiv Kerne (Mittelwert)
2 d	8	25	7,7
21 d	7	22	0,36
60 d	10	23	0

4.2.1 Zwei Tage nach Transplantation

Zwei Tage nach Transplantation wurden die meisten CM-DiI-markierten Alu-positiven Zellen gefunden. Der Mittelwert aller Alu-positiven Strukturen der untersuchten Schnitte lag bei 7,7 positiven Zellen pro Schnitt (siehe Tabelle 3). Für die parenchymal transplantierten Mäuse lag

der Mittelwert bei 16 positiven Zellen pro Schnitt, für die portal transplantierten Mäuse bei 6,2 positiven. Typische morphologische Befunde sind in Abbildung 6 dargestellt. Alu-positive Zellen wurden häufig in verletzten Arealen des Leberparenchyms gefunden. Die Läsionen entstanden wahrscheinlich im Zusammenhang mit der Transplantation und wurden nach parenchymaler und nach portaler Transplantation beobachtet. Ein Teil der Alu-positiven Zellen befand sich integriert zwischen intakten Leberzellen. Ein weiterer Teil wurde im Bereich der Endothelschicht von kleinen und mittleren Gefäßen beobachtet. Die Kerne dieser Zellen erschienen oft länglich und flach, vergleichbar mit Kernen der Endothelzellen.

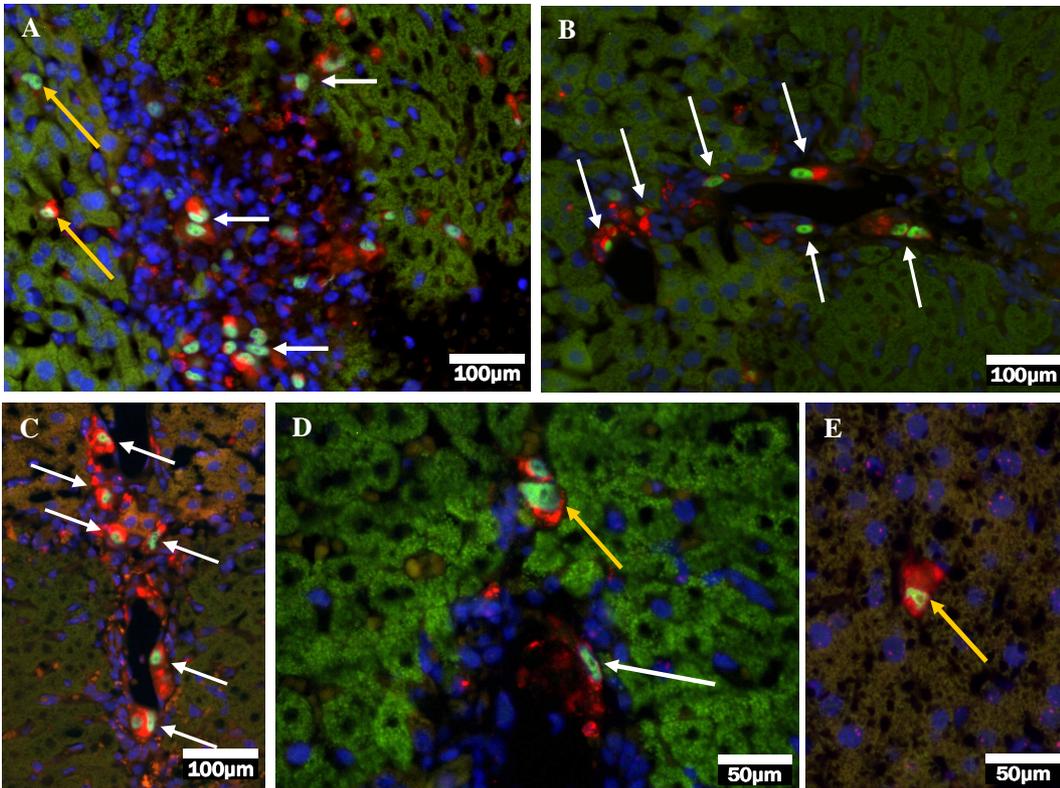


Abbildung 6: (A-E) In situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 2 d nach Transplantation von CM-DiI-markierten Neohepatozyten in Lebern von NOD/SCID-Mäusen. Overlays aus Cy2-Kanal (Alu, grün), Cy3-Kanal (CM-DiI, rot), DAPI-Kanal (Kernfärbung, blau). (A) Randbereich eines verletzten Gewebeareales (rechte Bildhälfte) in dem die charakteristischen runden Zellkerne der Hepatozyten (linke Bildhälfte) fehlen. CM-DiI-positive Zellen mit Alu-positiven Kernen befinden sich am Übergang zum gesunden Gewebe (weiße Pfeile), einige liegen integriert im intakten Lebergewebe (gelbe Pfeile). (B-E) CM-DiI-positive Zellen mit Alu-positiven Kernen im Endothelbereich von Gefäßen (weiße Pfeile). Die Alu-positiven Kerne dieser Zellen sind zum Teil länglich und flach. Einige Zellen sind ins Lebergewebe integriert (gelbe Pfeile).

Des Weiteren konnten in einzelnen Schnitten 2 d nach Transplantation Alu-positive Partikel nachgewiesen werden, die in Größe und Morphologie nicht mit Kernen übereinstimmten. Sie waren deutlich kleiner als die detektierten Menschkerne. Im DAPI-Kanal erfolgte ein DNS-Nachweis der Alu-positiven Partikel (siehe Abbildung 7). Bei den DNS-haltigen, Alu-positiven Partikeln handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Kernbruchstücke von untergegangenen humanen Zellen.

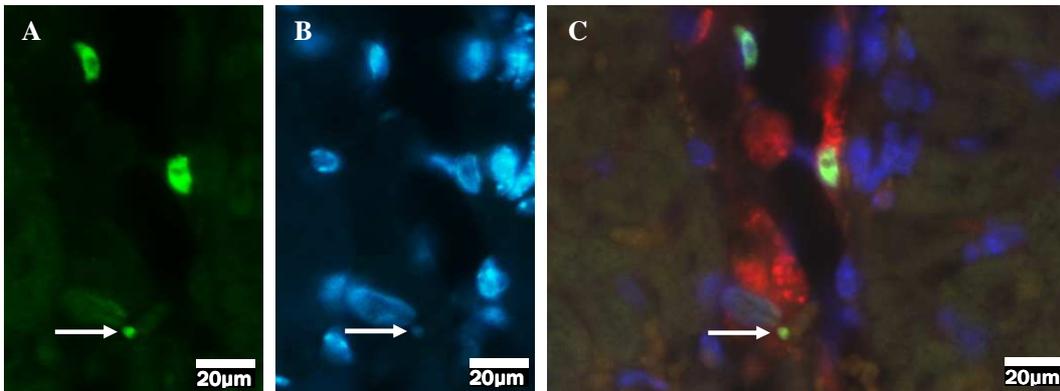


Abbildung 7: (A, B) In situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 2 d nach Transplantation von CM-DiI-markierten Neohepatozyten in die Leber einer NOD/SCID-Maus. (A) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün. In der oberen Bildhälfte liegen zwei Alu-positive Kerne. Der weiße Pfeil deutet auf einen Alu-positiven Partikel der seiner Größe nach als Kernbruchstück gedeutet wird. (B) DAPI-Kanal, DAPI-Kernnachweis ist blau, der Alu-positive Partikel stellt sich im DNS-Nachweis DAPI-positiv dar, es handelt sich um ein Alu-positives DNS-Fragment. (C) Overlay aus Cy2-, Cy3-, und DAPI-Kanal, CM-DiI ist rot. Die Alu-positiven Kerne und das DNS-Fragment (weißer Pfeil) können exakt mit DAPI-Kernnachweis kolokalisiert werden.

4.2.2 21 Tage nach Transplantation

Die Zahl der Alu-positiven Kerne hatte zum Zeitpunkt 21 d nach Transplantation drastisch abgenommen. Im Mittel wurden 0,36 Alu-positive Kerne pro Schnitt gefunden. Die Kerne befanden sich in bindegewebsreichen, CM-DiI-positiven Arealen. Die Alu- und CM-DiI-positiven Zellen wurden von fibroblastenartigen Zellen umgeben oder befanden sich am Rand kleiner Gefäße. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den bindegewebsreichen Arealen mit fibroblastenartigen Zellen um Narbengewebe von Transplantationsverletzungen handelt (siehe Abbildung 8). In Lebern von mehreren Versuchstieren fanden sich CM-DiI-positive Areale und einzelne, von intaktem Gewebe umgebene CM-DiI-positive Zellen (nicht dargestellt). Ein Nachweis von humanen Kernen mittels Alu-Sonde gelang hier jedoch nicht.

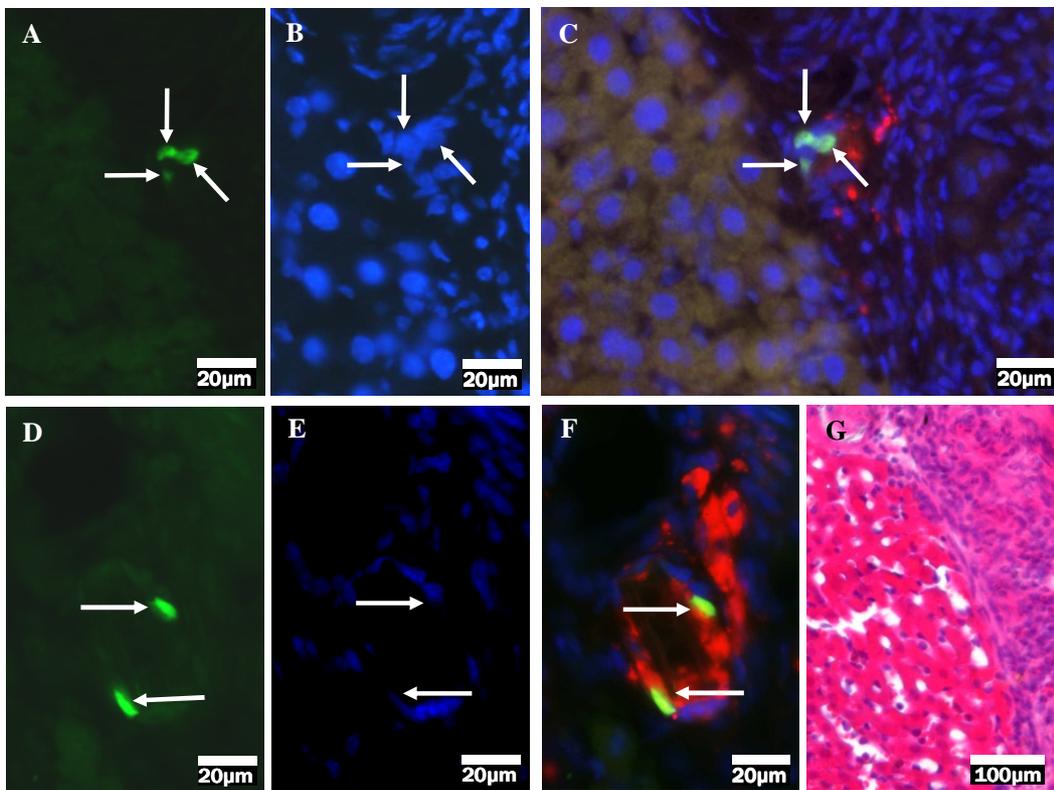


Abbildung 8: In Situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 21d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen. (A, D) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün, Alu-positive Kerne werden durch weiße Pfeile markiert. (B, E) DAPI-Kanal, DAPI-Kernnachweiß ist blau, den Alu-positiven Strukturen können im DAPI-Kanal Kerne zugeordnet werden (weiße Pfeile). (C, F) Overlay aus Cy2-, DAPI-, und Cy3-Kanal, CM-DiI ist rot. Die Alu-positiven Kerne liegen in CM-DiI positiven Zellen. Die Zellen in (F) liegen am Rand eines kleinen Gefäßes, die Zellkerne sind flach und länglich (weiße Pfeile). Die Alu-positiven Kerne in (C) sind von fibroblastenartigen Kernen umgeben (rechte Bildhälfte). (G) mit HE-Färbung wurde das bindegewebereiche Areal aus (C) in einem Nachbarschnitt dargestellt (rechte Bildhälfte). Angrenzend liegt intaktes Leberparenchym (linke Bildhälfte).

4.2.3 60 Tage nach Transplantation

In den Lebern, die 60 Tage nach der Transplantation entnommen wurden, konnten keine Alu-positiven Kerne nachgewiesen werden. In einigen Lebern fanden sich auch zu diesem Zeitpunkt CM-DiI-positive Areale und einzelne CM-DiI-positive Zellen. In Kernen dieser Zellen wurde Mouse Major Satellite mit der ISH nachgewiesen (Abbildung 9). Somit wurden 60 Tage nach Transplantation CM-DiI-positive Zellen nachgewiesen, die einen Mausekern tragen. Alu-positiv Kerne wurden nicht nachgewiesen.

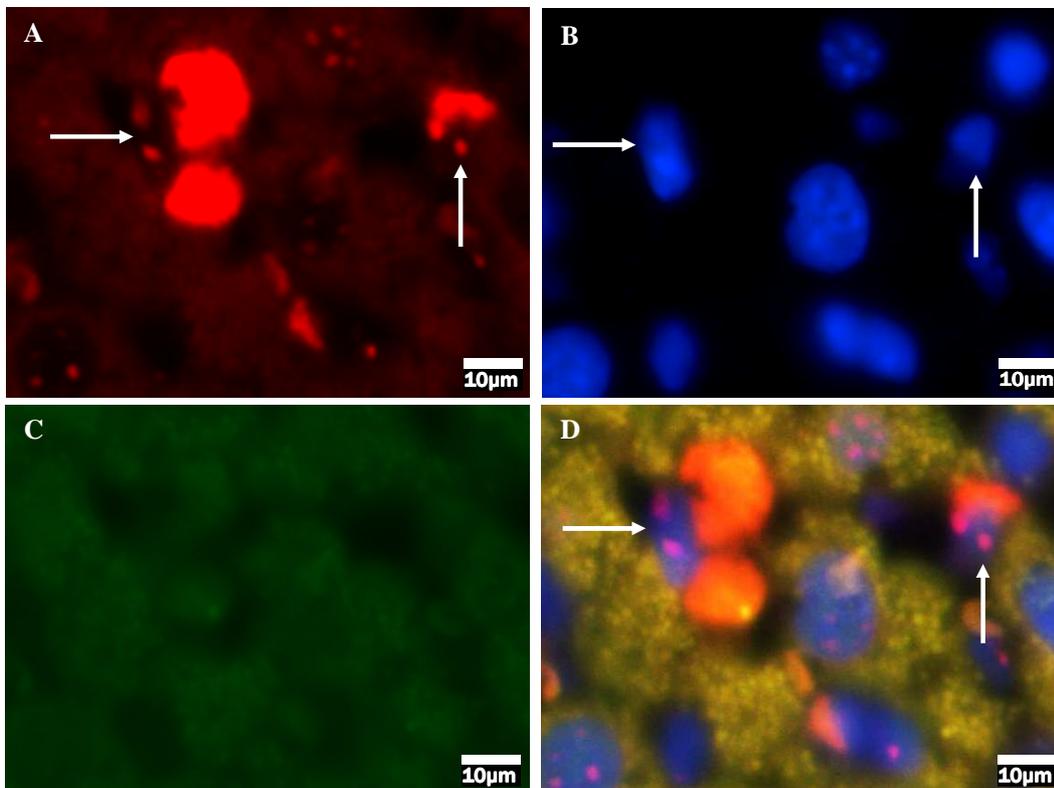


Abbildung 9: In situ Hybridisierung mit Alu- und MMS-Sonde 60 d nach Transplantation von CM-DiI markierten Neohepatozyten. (A) Cy3-Kanal, CM-DiI ist rot, flächig, MMS-Sonde ist rot, punktförmig. Bei den CM-DiI-positiven Zellen befinden sich punktförmige MMS-Sondensignale (weiße Pfeile). (B) DAPI-Kanal, DAPI Kernnachweiß ist blau, den MMS-Sondensignalen aus (A) können Kernstrukturen zugeordnet werden (weiße Pfeile). (C) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün, im entsprechende Bereich aus A, B lässt sich keine Alu-Sonde nachweisen. (D) Overlay aus Cy2, Cy3 und DAPI. Die Kerne der CM-DiI-positiven Zellen können mit den MMS-Signalen exakt kolokalisiert werden (weiße Pfeile). Die CM-DiI-positiven Zellen tragen einen Mauskern.

4.3 Analyse adhären proliferierender Nabelschnurblutzellen nach unterschiedlicher Verweildauer in Lebern von NOD/SCID-Mäusen

Vergleichend zu den Neohepatozyten sollte das Schicksal von Nabelschnurblutzellen nach Transplantation in Mauslebern untersucht werden. Dabei sollten auch die frühen Zeitpunkte nach Transplantation analysiert werden. Nach Markierung der adhären proliferierenden Nabelschnurblutzellen mit CM-DiI wurden diese in den Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen transplantiert und nach 4 h, 12 h, 24 h, 5 d und 21 d entnommen. Die Identifizierung der transplantierten Zellen wurde analog zu den Neohepatozyten durchgeführt. Mittels ISH

auf Alu-Sequenzen wurden in den Mausebern menschliche Kerne in CM-DiI-positiven Zellen dargestellt.

4.3.1 Semiquantitative Analyse der Alu-positiven Kerne

In diesem Versuch sollte das Schicksal der Nabelschnurblutzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation untersucht werden. Ein Schwerpunkt lag auf den frühen Zeitpunkten nach der Transplantation. Wie bei den Neohepatozyten beschrieben eignet sich dieses semiquantitative Verfahren nicht zur statistischen Auswertung, sondern zur Darstellung von offensichtlichen Trends. Von 4 h bis 24 h nach Transplantation von 750.000 Zellen wurde eine Zunahme der Alu-positiven Zellen gefunden, mit einem Maximum nach 24 h, im Mittel 26,6 Zellkerne pro Schnitt. Im weiteren Verlauf wurde eine Abnahme der positiven Strukturen gefunden, nach 21 d im Mittel noch 1,5 Alu-positiv Kerne pro Schnitt.

Tabelle 4: Anzahl der Alu-positiven Kerne zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von 750.000 adhären proliferierenden Nabelschnurblutzellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen

Entnahme der transplantierten Lebern nach	Versuchtiere pro Gruppe	Anzahl der untersuchten Schnitte	Alu-positiv Kerne (Mittelwert)
4 h	3	8	9,1
12 h	3	9	13,6
24 h	3	10	26,6
5 d	3	7	6,7
21 d	4	15	1,5

4.3.2 Mikroskopische Auswertung

Zu den frühen Zeitpunkten 4 h, 12 h, 24 h und 5 d wurden starke Gewebeläsionen mit Gewebsuntergang in den Lebern gefunden, vergleiche Abbildung 10. Die transplantierten Zellen wurden zum Großteil in den nekrotischen Arealen und im Lumen von Blutgefäßen am Übergang zu intaktem Gewebe gefunden. Wie nach der Transplantation von Neohepatozyten wurden die Gewebsverletzung auf die Transplantation zurückgeführt und nach 21 d nicht mehr beobachtet. Auch im Bindegewebe um kleinere und mittlere Gefäße wurden häufig Alu-positiv Zellen gefunden. Vor allem zum Zeitpunkt 24 h und 5 d stellten sich Alu-positiv

Zellen im Bereich der Gefäßinnenwand dar. Diese Zellen hatten zum Teil einen flachen Zellkern, vergleichbar mit von Endothelzellen. 21 Tage nach Transplantation wurden einzelne Alu-positive Kerne im Bindegewebe um Gefäße oder in Zellkonglomeraten im Gewebe gefunden. Die Zellkonglomerate hatten eine strangartige oder flächige Form. Die darin enthaltenen Zellen waren stets positiv für CM-DiI. Die Alu-positiven Zellkerne waren klein und von oval-gebogener Form. Damit glichen sie nicht den Kernen der umliegenden Maushepatozyten. Die Alu-positiven Kerne im Bereich der Gefäße lagen im Endothelbereich, ihre Kerne waren zum Teil flach und länglich und glichen wie zu früheren Zeitpunkten beobachtet den Kernen von Endothelzellen.

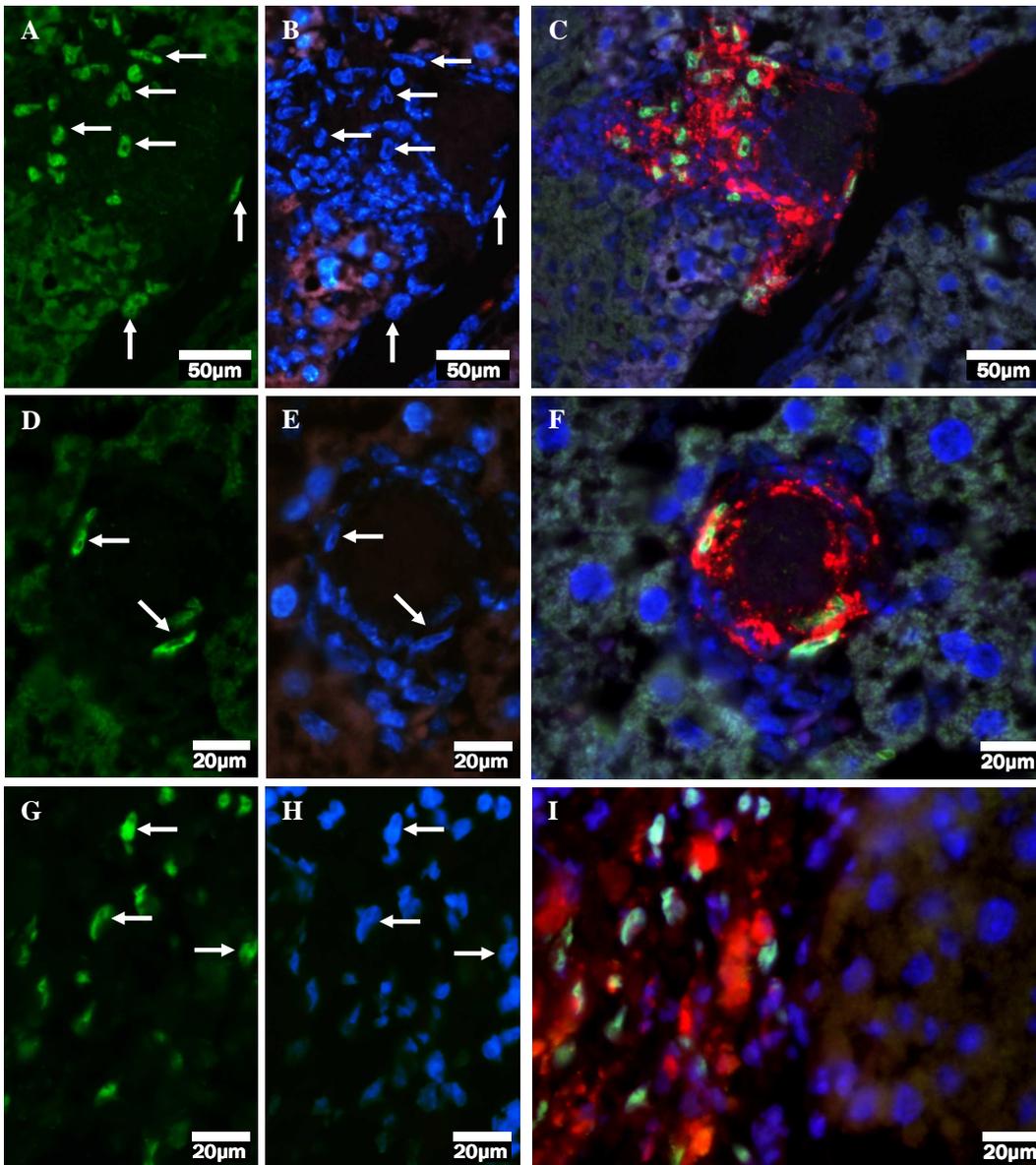


Abbildung 10: In Situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 24 h, 5 d und 21 d nach Transplantation von CM-DiI-markierten Nabelschnurblutzellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen. (A, D, G) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün. Alu-positive Kerne sind mit weißen Pfeilen markiert. (B, E, H) DAPI-Kanal, DAPI-Kernnachweis ist blau. Die Alu-positiven Strukturen aus dem Cy2-Kanal können formgleichen Kernen im DAPI-Kanal zugeordnet werden (weiße Pfeile). (C, F, I) Overlay aus Cy2-, Cy3-, und DAPI-Kanal, CM-DiI ist rot. (A-C) 24 h nach Transplantation, Alu-positive Kerne in CM-DiI positiven Bereichen liegen im Gewebe und im Gefäßlumen. (D-F) 5 d nach Transplantation, CM-DiI und Alu-positive Kerne liegen am Gefäßrand, die Zellkerne sind flach und länglich. (G-I) 21 d nach Transplantation, die Alu-positive Kerne liegen in einem CM-DiI positiven Areal (linke Bildhälfte) im Leberparenchym. Die Alu-Kerne sind oval oder kommaförmig. Sie sind kleiner als Maushepatozytenkerne (rechte Bildhälfte).

4.4 Nachweis von Humanalbumin

Mit dem kombinierten Nachweis von CM-DiI und Alu-Sequenzen in einer Zelle konnten die transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen zuverlässig in den Leberschnitten nachgewiesen werden. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die transplantierten Zellen in Richtung Hepatozyten differenziert hatten. Als leberzellspezifisches Markerprotein diente humanes Albumin, da dieses ein entscheidendes Entwicklungsstadium in der Differenzierung von Hepatozyten darstellt (Hengstler *et al.* 2005). Der Nachweis von humanem Albumin erfolgte mittels immunhistochemischer Färbung mit DAB (*Diaminobenzidin*) als Chromogen.

4.4.1 Scheintransplantierte NOD/SCID-Mäuse als Negativkontrolle

Als Differenzierungsmarker sollte humanes Albumin in transplantierten Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Stamm- und Vorläuferzellen wurden in einer Suspension aus Zellkulturmedium (William's Medium E) und FCS-haltigem Medium (*fetal calf serum*) in die Mauslebern transplantiert (siehe Punkt 3.3.2). Um die Einflüsse der Transplantation und Kreuzreaktionen der immunhistochemischen Färbung mit Zellkulturmedium auszuschließen, wurden NOD/SCID-Mäuse mit Zellkulturmedium, physiologischer NaCl-Lösung oder 10%-FCS scheintransplantiert. Die Scheintransplantation erfolgte analog zur Stammzelltransplantation in den linken Leberlappen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Mit verschiedenen Medien scheintransplantierte Mäuse als Negativkontrollen

Injektionsmedium	Anzahl transplantiert Mäuse	Anzahl untersuchter Schnitte	Mittelwert DAB- positiver Strukturen / Schnitt
NaCl	1	12	0,17
FCS	2	22	0,14
William's Medium E	8	92	0,04

Leberschnitte der scheintransplantierten Mäuse dienten als Negativkontrollen bei der Etablierung und Anwendung der IHC auf humanes Albumin. In 126 gefärbten Schnitten scheintransplantiertter Mäuse wurden insgesamt 9 positive Strukturen gefunden. Dies entspricht einem Mittelwert von 0,07 falsch-positiven Strukturen pro Schnitt. Am höchsten war der Mittelwert falsch-positiver Signale bei den Mäusen, die mit NaCl transplantiert

wurden. Als Positivkontrolle für die IHC auf humanes Albumin dienten Paraffinschnitte von humanen Lebern. Diese zeigten stets eine zelluläre Braunfärbung als Nachweis humanen Albumins durch DAB. Die Spezifität des verwendeten Antikörpers gegen humanes Albumin ist in Abbildung 11 dargestellt.

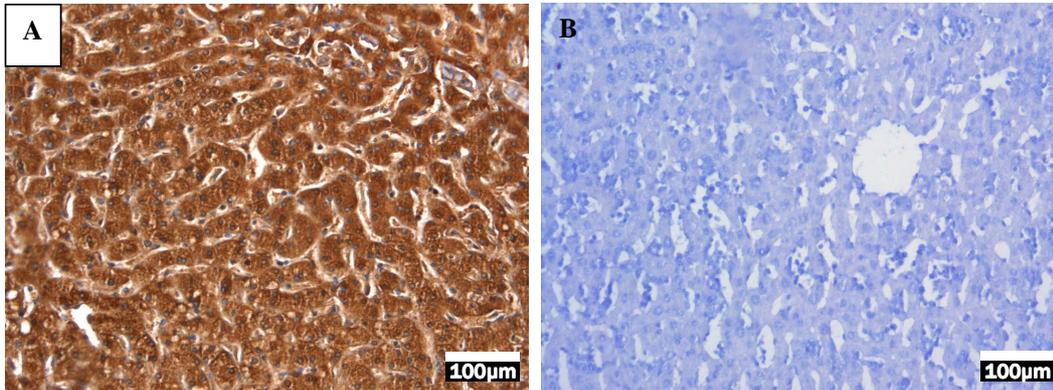


Abbildung 11: Methodische Kontrolle der Immunhistochemie auf humanes Albumin. Humanalbumin positive Zellen sind braun (DAB). Die Schnitte wurden mit Mayers-Hämalaun gegengefärbt, dabei sind Zellkerne dunkelblau und das Zytoplasma hellblau. (A) Ein Gewebeschnitt aus humaner Leber diente als Positivkontrolle, die Humanalbumin-haltigen Hepatozyten färben sich braun (DAB). (B) Ein Gewebeschnitt aus einer scheintransplantierten NOD/SCID-Maus diente als Negativkontrolle. Hier sind keine DAB-positiven Zellen zu finden.

4.4.2 Transplantation humaner Hepatozyten

Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass humanes Albumin in transplantierten Mauslebern mit der IHC nachgewiesen werden kann. Es wurden 750.000 primäre humane Hepatozyten in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen transplantiert. Nach 21 d erfolgte die Explantation. In Leberschnitten wurden nach der IHC DAB-positive Zellgruppen gefunden (siehe Abbildung 12). Der Mittelwert in 64 untersuchten Schnitten lag bei 1,86 Humanalbumin-positiven Strukturen pro Schnitt.

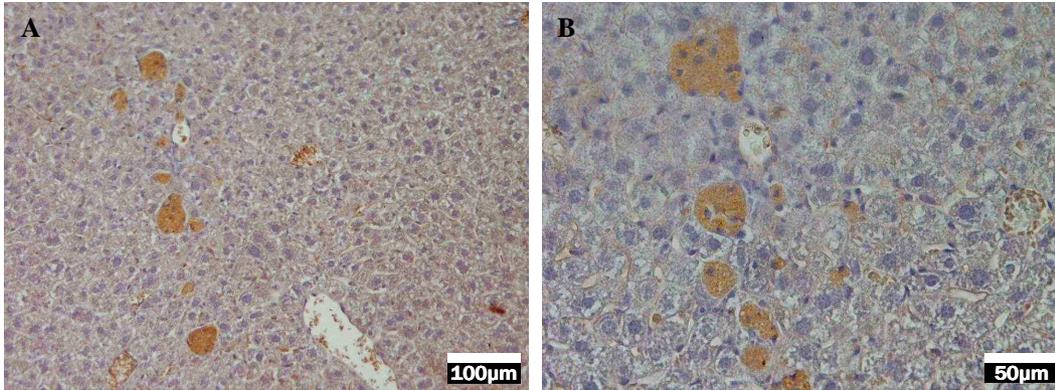


Abbildung 12: (A,B) Immunhistochemie 21 d nach Transplantation primärer humaner Hepatozyten in das Parenchym des linken Leberlappens. Humanalbumin-positive Zellen sind braun (DAB), Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun, die Kerne sind hierbei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau. Humanalbumin-positive Zellen liegen einzeln und gruppiert im Leberparenchym.

4.4.3 Immunhistochemie der Stammzellen vor Transplantation

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die verwendeten Nabelschnurblutzellen vor der Transplantation Albumin exprimieren. Dazu wurden adhärent wachsende Nabelschnurblutzellen auf SuperFrostPlus Objektträgern kultiviert und immunhistochemisch auf humanes Albumin gefärbt. Als Positivkontrolle wurden HepG2-Zellen (*hepatozelluläre* Karzinomlinie) auf Objektträgern kultiviert (nicht dargestellt). Wie in Abbildung 13 exemplarisch dargestellt wurde in den Nabelschnurblutzellen mit der IHC kein Albumin nachgewiesen. Von den Neohepatozyten wurden keine Kulturen auf Objektträgern angelegt, da für die Anzucht Kulturflaschen mit spezieller Oberflächenstruktur notwendig sind. Die Medienüberstände von Neohepatozyten wurden von einer kooperierenden Arbeitsgruppe auf Albumin untersucht; hierbei wurde gezeigt, dass Neohepatozyten eine Albuminsekretion besitzen, die mit der von primären Hepatozyten vergleichbar ist (Ruhnke *et al.* 2005b).

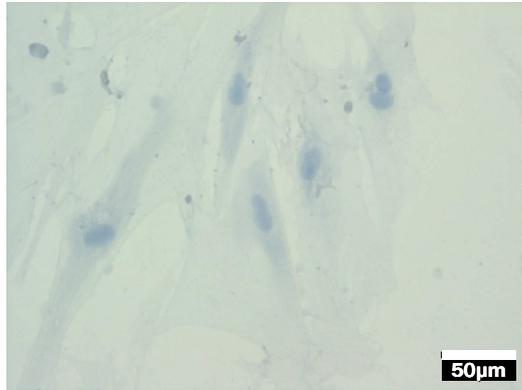


Abbildung 13: Immunhistochemie auf humanes Albumin nach Kultivierung von adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen auf Superfrost-Plus-Objektträgern. Humanes Albumin ist braun (DAB), Gegenfärbung mit Mayers Hämalau, die Kerne sind dabei dunkelblau und das Zytoplasma hellblau. Die Zellen sind negativ für humanes Albumin.

4.5 Immunhistochemie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von Neohepatozyten

In diesem Versuch sollte die Exprimierung von humanem Albumin zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von Neohepatozyten in Lebern von NOD/SCID-Mäusen analysiert werden. Paraffinschnitte der Lebern transplantierten Versuchstiere wurden dazu immunhistochemisch auf die Exprimierung humanen Albumins untersucht. Es wurden Lebern zu den Zeitpunkten 2 d, 21 d und 60 d nach Transplantation untersucht. Zum frühen Zeitpunkt nach 2 d wurden in den Untersuchungen starke Gewebeläsionen beobachtet (siehe Punkt 4.2.1). In Schnitten von scheintransplantierten Versuchstieren wurden bis zum Entnahmezeitpunkt 5 d nach Transplantation mit der IHC falsch-positive Signale in den verletzten Arealen gefunden. Da bei gleichem Verletzungsmuster in diesem Versuch mit Kreuzreaktionen zu rechnen war, wurden die Leberschnitte 2 d nach Transplantation nicht mit der IHC auf humanes Albumin untersucht.

4.5.1 Semiquantitative Analyse nach Transplantation von Neohepatozyten

Zum Zeitpunkt 21 d und 60 d konnten mit der IHC Humanalbumin-positive Zellen dargestellt werden. Durch die Auszählung der mittels IHC detektierten Zellen wurden die Experimente analysiert. Wie bei der ISH beschrieben ist diese Methode als semiquantitativ einzustufen und eignet sich für die Darstellung von offensichtlichen Trends. Nach 21 Tagen lag der Mittelwert bei 2,9 Humanalbumin-positiven Strukturen pro Schnitt (14 untersuchte Schnitte aus 9 Versuchstieren). Nach 60 Tagen wurden im Mittel 0,7 positive Strukturen gezählt (21 untersuchte Schnitte aus 10 Versuchstieren), siehe Tabelle 6.

Tabelle 6: Humanalbumin-positive Zellen in den Lebern von NOD/SCID-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von 750.000 aus mononukleären Zellen vordifferenzierte Neohepatozyten

Entnahme der transplantierten Lebern nach	Versuchstiere pro Gruppe	Anzahl der untersuchten Schnitte	Humanalbumin-positive Zellen pro Schnitt (MW*)
21 d	7	14	2,93
60 d	10	21	0,71

*Mittelwert

4.5.2 Zwei Typen Humanalbumin-positiver Zellen

Bei der mikroskopischen Auswertung der Humanalbumin-positiven Zellen zum Zeitpunkt 21 d wurden zwei morphologisch unterschiedliche Zelltypen gefunden. Diese wurden bei der Auswertung in Typ I und Typ II Zellen eingeteilt. Die Typ I Zellen waren kleiner als Hepatozyten und trugen einen dichten, dezentral gelegenen Kern. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war im Vergleich zu Hepatozyten zugunsten des Zytoplasmas verschoben. Die Typ I Zellen traten meist in Konglomeraten von 5 bis 20 dicht beieinander liegenden Zellen auf. Diese Konglomerate befanden sich entweder im Lumen kleiner Gefäße (Typ Ia) oder waren in das Gewebe integriert (Typ Ib, siehe Abbildung 14). Eine systematische Zuordnung zu perizentralen oder periportalen Läppchenanteilen bestand in den untersuchten Präparaten nicht.

Beim Typ II der Humanalbumin-positiven Zellen, handelte es um Zellen, die morphologisch einem Hepatozyten glichen. In der Mitte ihrer polygonalen Grundform trugen Typ II Zellen

einen runden Zellkern. Sie lagen vereinzelt und integriert im Gewebe (siehe Abbildung 14). Von den umliegenden Hepatozyten konnten sie nur durch die IHC unterschieden werden.

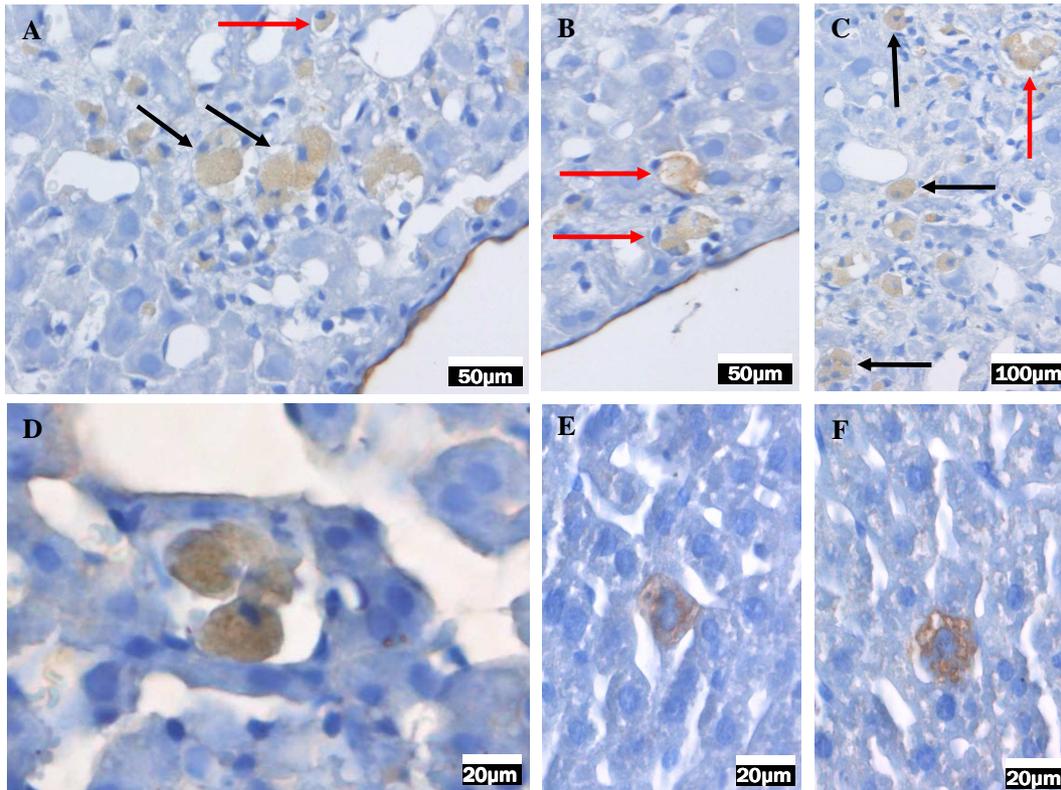


Abbildung 14: (A-F) Immunhistochemie auf humanes Albumin 21 d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen. Humanes Albumin ist braun (DAB), Zellkerne sind dunkelblau, Zytoplasma hellblau (Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun). (A-C) Die Humanalbumin-positiven Zellen sind kleiner als die umliegenden Maushepatozyten. Sie treten gruppiert auf. Ihre Zellkerne sind kleiner und dichter als Maushepatozytenkerne, sie haben eine oval-gebogene Form und liegen am Rand der Zelle. Humanalbumin-positive Zellen dieser Morphologie werden als Typ I Zellen bezeichnet. Die Typ I Zellen liegen im Parenchym (schwarze Pfeile, Typ Ia) oder im Lumen von kleinen Gefäßen (rote Pfeile, Typ Ib). (D) Humanalbumin-positive Typ Ib Zelle im Lumen eines kleinen Gefäßes. (E, F) Humanalbumin-positive Zellen mit einer polygonalen Form und rundem mittigen Kern. Die Zellen sind in Form und Größe mit Maushepatozyten vergleichbar und liegen integriert im Parenchym. Zellen dieser Morphologie werden als Typ II Zellen bezeichnet.

4.6 Immunhistochemie nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen

Vergleichend zu den Neohepatozyten wurde 21 d nach Transplantation der adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen die Expression von humanem Albumin untersucht. Dazu wurden die Zellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen transplantiert. Nach 21 d wurden die Lebern entnommen. Ab diesem Zeitpunkt wurden in den Studien mit

unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten transplantierte Lebern keine Nekrosen und Entzündungsreaktionen mehr nachgewiesen (siehe Punkt 4.3.2). Um eine Verfälschung der Ergebnisse der IHC durch diese pathologischen Gewebezustände zu vermeiden, wurde der Entnahmezeitpunkt 21 d für den Nachweis humanen Albumins gewählt.

4.6.1 Semiquantitative Analyse nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen

Paraffinschnitte der Mauslebern wurden mit der IHC auf die Expression von humanem Albumin untersucht. Die durchgeführten Transplantationen, die Anzahl der untersuchten Schnitte und die gezählten Humanalbumin-positiven Strukturen sind in Tabelle 7 dargestellt. Wie zuvor beschrieben unterliegt diese Analyse abhängig von der Position der Schnitte in der Leber und von den einzelnen Versuchstieren starken inter- und intraindividuellen Schwankungen. Daher eignet sich die Analyse nicht für die statistische Auswertung sondern zeigt offensichtliche Trends. Insgesamt wurden 116 Leberschnitte von 30 Versuchstieren untersucht. Bei einer Schwankung zwischen 0 und 2,56 Humanalbumin-positiven Zellen pro Schnitt in den einzelnen Transplantationen lag der Mittelwert über alle Experimente bei 1,23 Humanalbumin-positiven Zellen pro Schnitt.

Tabelle 7: Quantitative Auswertung Humanalbumin-positiver Typ I und Typ II Zellen 21 d nach Transplantation von 750.000 adhärenz proliferierenden Nabelblutschnurzellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen

Transplantation <i>TX</i>	Anzahl Versuchstiere	Untersuchte Schnitte	Typ I Zellen pro Schnitt (Mittelwert)	Typ II Zellen pro Schnitt (Mittelwert)	Σ Humanalbumin-positiver Zellen pro Schnitt (Mittelwert)
<i>TX 1</i>	4	18	1,78	0,06	1,84
<i>TX 2</i>	4	14	0	0	0
<i>TX 3</i>	3	14	1,93	0,64	2,57
<i>TX 4</i>	4	16	0,19	1,06	1,25
<i>TX 5</i>	9	36	1,22	1,36	2,58
<i>TX 6</i>	3	12	0	0	0
<i>TX 7</i>	3	6	0	0,33	0,33
Summe	30	116			
Mittelwerte von allen untersuchten Schnitten			0,55	0,68	1,23

4.6.2 Mikroskopische Auswertung

Wie bei den Neohepatozyten fielen bei der mikroskopischen Auswertung zwei unterschiedliche Typen von Humanalbumin-positiven Zellen auf. Die kleineren, häufig gruppiert auftretenden Typ I Zellen im Gewebe oder in ehemaligen Gefäßen wurden von den Hepatozyten-ähnlichen Typ II Zellen unterschieden (siehe Abbildung 15). Eine systematische Lokalisation zu perizentralen oder periportalen Läppchenanteilen bestand auch hier nicht. Mit einem Anteil von 45% aller gezählten Humanalbumin-positiven Strukturen wurden die Typ I Zellen nach Transplantation von adhärent proliferierenden Nabelschnurzellen etwas seltener als die Typ II Zellen (55%) gefunden.

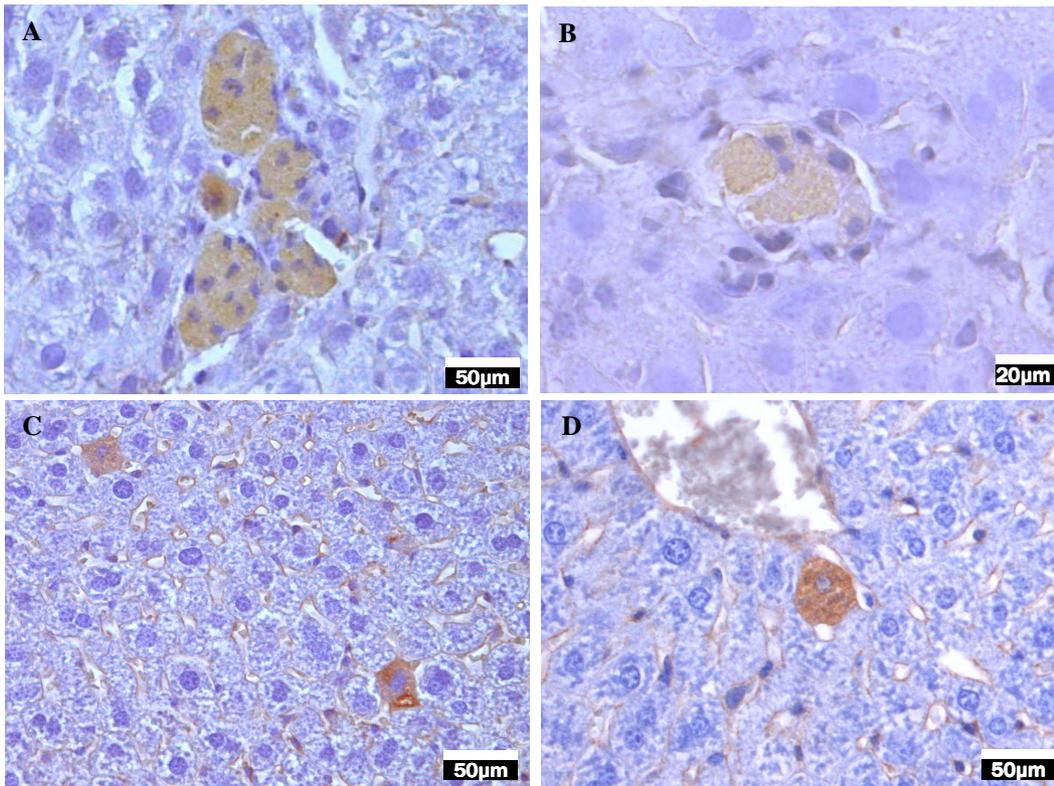
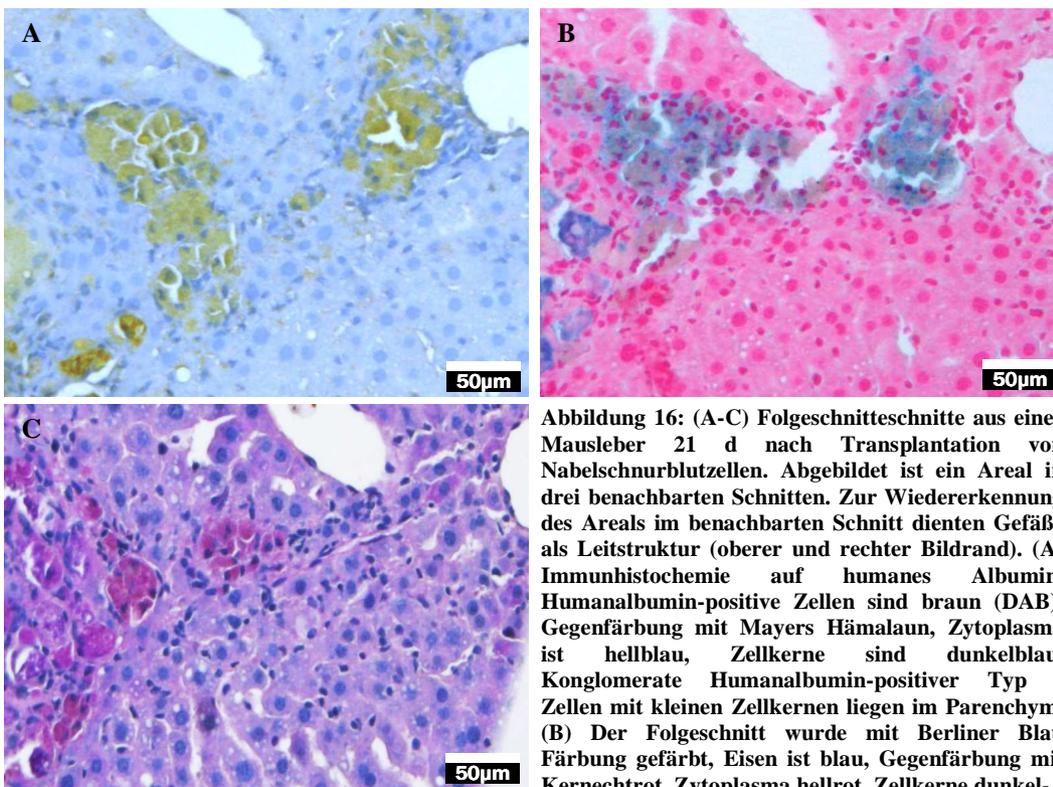


Abbildung 15: (A-D) Immunhistochemie auf humanes Albumin 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen. Humanes Albumin ist braun (DAB), Zellkerne sind dunkelblau, Zytoplasma hellblau. (A, B) Einzelne Zellen und Zellkonglomerate von braunen, Humanalbumin-positiven Zellen liegen im Parenchym (Typ Ia Zellen) und in kleinen Gefäßen (Typ Ib Zellen). Die Zellkerne sind kleiner und dichter als die der umliegenden Maushepatozyten. Häufig liegen sie am Zellrand. (C, D) Humanalbumin-positive Typ II Zellen: die braunen Zellen liegen einzeln im Parenchym integriert. Wie die umliegenden Maushepatozyten ist ihre Form polygonal und sie tragen einen runden, mittigständigen Kern.

4.7 Untersuchung von Typ I Zellen mit histologischen Standardfärbungen

An ausgewählten Präparaten wurden transplantierte Zellen mit histologischen Standardfärbungen untersucht, um exemplarisch das Vorkommen bestimmter Stoffwechselprodukte zu überprüfen. Die transplantierten Zellen wurden anhand der charakteristischen Morphologie und Lage identifiziert. Humanalbumin-positive Typ II Zellen wurden häufig in Gruppen von 5 bis 30 Zellen gefunden. Wie in Abbildung 16 dargestellt wurden größere Zellkonglomerate bei der Herstellung der 5 µm dicken Gewebeschnitte meist mehrmals angeschnitten. So konnten die Zellgruppen in benachbarten Gewebeschnitten anhand der Lokalisation und Morphologie wiedergefunden werden.



rot. Im entsprechenden Areal finden sich eisenhaltige Zellgruppen mit der Morphologie von Typ I Zellen. (C) Der Folgeschnitt wurde zum Glykogenachweis mit der PAS-Färbung gefärbt. PAS-positive Zellen sind violett, Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. Die Zellen mit der Morphologie von Typ I Zellen im entsprechenden Areal sind PAS-positiv.

4.7.1 PAS-Färbung zur Darstellung von Glykogenspeicherung

In exemplarischen Präparaten wurde Glykogen mit der PAS-Reaktion dargestellt. Die stark violetten, glykogenhaltigen Zellen glichen mit ihrer charakteristischen Form und Lage Humanalbumin-positiven Typ I Zellen (siehe Abbildung 17) und konnten in Nachbarschnitten mit solchen kolokalisiert werden (nicht abgebildet). In den scheintransplantierten Kontrollen wurden keine derartigen glykogenhaltigen Zellen gefunden.

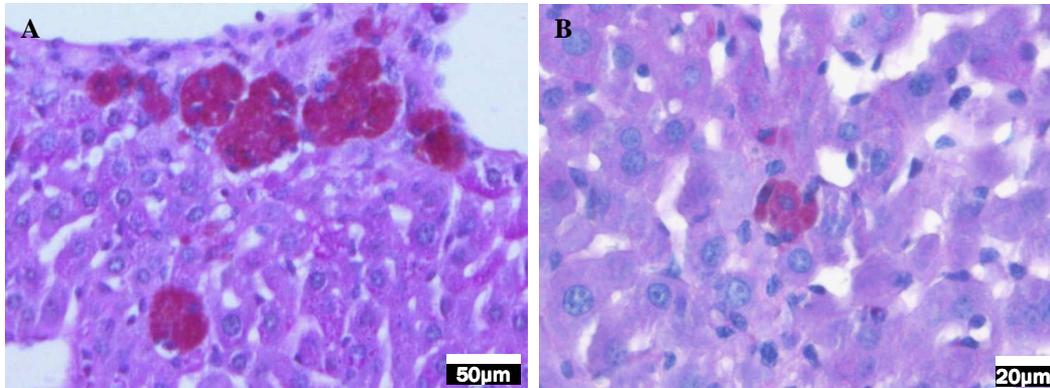


Abbildung 17: (A, B) PAS-Färbung zum Glykogennachweis an Leberschnitten von NOD/SCID-Mäusen 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen. PAS-positive Zellen sind violett, Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. In Nachbarschnitten von A, B wurden in den entsprechenden Arealen Humanalbumin-positive Typ I Zellen gefunden (Ergebnisse nicht abgebildet). Nach PAS-Färbung finden sich PAS-positive Zellen mit der Morphologie von Typ I Zellen in Gruppen (A) oder einzeln (B) im Gewebe.

4.7.2 Eisennachweis durch Berliner Blau Reaktion

Zur Darstellung von eisenhaltigen Strukturen wurden einige Schnitte mit der Berliner Blau Reaktion bearbeitet. Eisen färbt sich dabei tief blau. Zur besseren Gewebedarstellung wurden die Schnitte mit Kernechtrot gegengefärbt. Für die Untersuchungen wurden Präparate gewählt, in denen das Vorkommen von Typ I Zellen aus vorangegangenen IHC bekannt war. In den gefärbten Schnitten wurden eisenhaltige Zellareale gefunden, die den charakteristischen Zellkonglomeraten von Typ I Zellen glichen (siehe Abbildung 18).

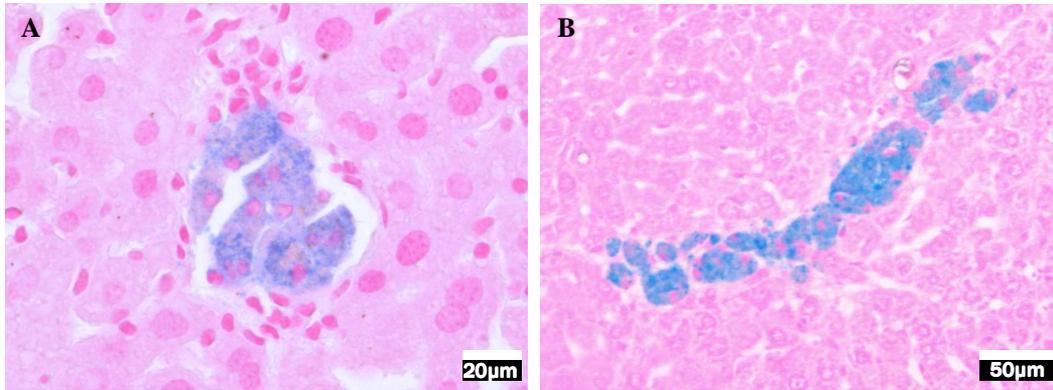


Abbildung 18: (A,B) Berliner Blau Färbung an Leberschnitten von NOD/SCID-Mäusen 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen. Eisen ist blau, Gegenfärbung mit Kernechtrot, Zytoplasma hellrot, Zellkerne dunkelrot. In Nachbarschnitten von A, B wurden in den entsprechenden Arealen Humanalbumin-positive Typ I Zellen gefunden (Ergebnisse nicht abgebildet). Nach Berliner Blau Färbung finden sich eisenhaltige Zellen mit der Morphologie von Typ I Zellen in einem Gefäß (A) und im Parenchym (B).

4.8 Genetischer Ursprung von Humanalbumin-positiven Zellen

In der Auswertung der IHC wurden zwei unterschiedliche Typen Humanalbumin-positiver Zellen gefunden. Um diese Typ I und Typ II Zellen genetisch zu charakterisieren, wurde an ausgewählten Leberschnitten die Alu-ISH und die IHC auf humanes Albumin in Kombination durchgeführt.

4.8.1 Kombination von *in situ* Hybridisierung und Immunhistochemie auf humanes Albumin

Die Kombination von Alu-ISH und die IHC auf humanes Albumin wurde an humanen Leberschnitten und scheintransplantierten NOD/SCID-Mäusen etabliert. Diese dienten als Positiv- und Negativkontrollen. Paraffinschnitte dieser Lebern wurden mit Alu-Sonden und zum Teil auch mit MMS-Sonden hybridisiert. Im Anschluss wurde humanes Albumin immunhistochemisch dargestellt und dann die Gensonden detektiert. Bei einem Teil der untersuchten Schnitte wurde auf eine Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun verzichtet, da dieses die Fluoreszenz unterdrücken kann. In einem Gewebeschnitt wurde so im Durchlicht humanes Albumin als Braunfärbung, Alu-Sonde im Cy2-Kanal und MMS-Sonde im Cy3-Kanal dargestellt. Die unspezifische Kernfärbung mittels DAPI erschien im dazugehörigen

Kanal blau. Die Spezifität der kombinierten Nachweisverfahren war vergleichbar zu den einzeln angewendeten Verfahren (siehe Punkt 4.1.3 und 4.4.1) und ist in Abbildung 19 dargestellt.

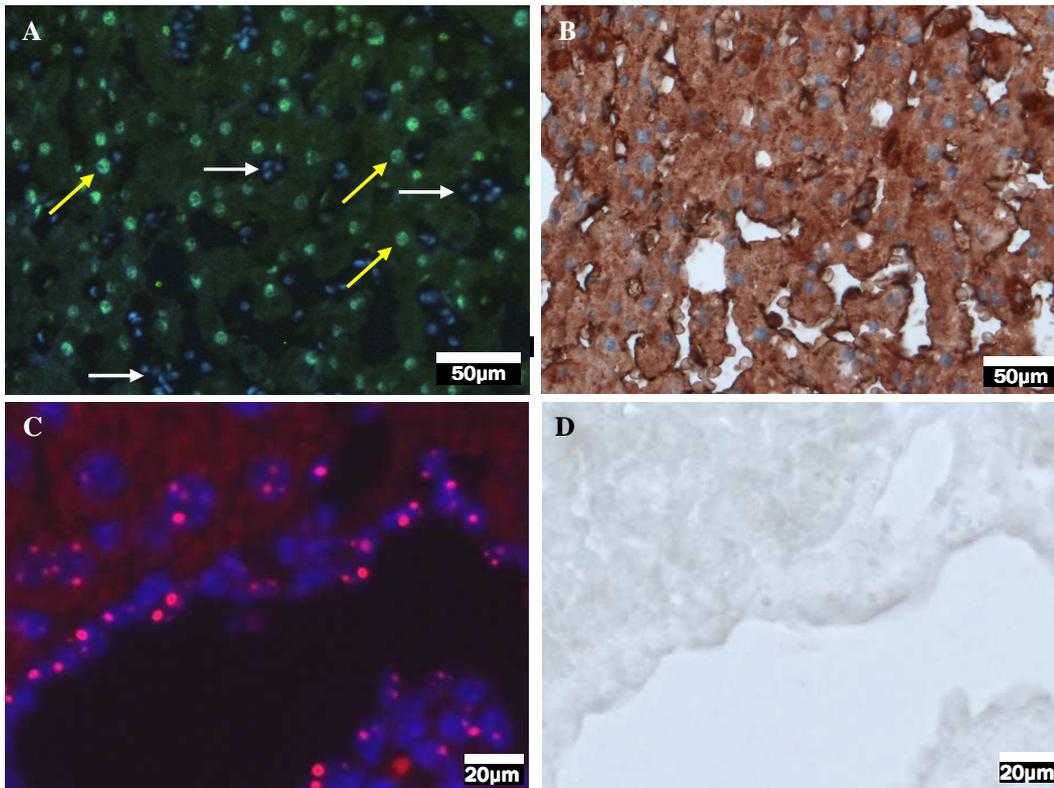


Abbildung 19: Kombination von *in situ* Hybridisierung (Alu, MMS) und Immunhistochemie auf humanes Albumin an humaner Leber (A,B) und Leber einer scheintransplantierten NOD/SCID-Maus (C,D). Die Schnitte dienen als Positiv- und Negativkontrolle. (B) Fusionsbild aus Cy2-Kanal und DAPI-Kanal. Mit DAPI-Kernnachweis kolokalisierte Alu-positive Menschkerne fluoreszieren kräftig türkis (gelbe Pfeile), Erythrozyten sind im Fusionsbild durch ihre Autofluoreszenz blau (weiße Pfeile). (B) Durchlichtaufnahme, humanes Albumin ist braun (DAB), Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun, Zellkerne sind blau. Humanes albumin wird gleichmäßig in der Positivkontrolle dargestellt. (C) Fusionsbild aus Cy3-Kanal (MMS-Sonde ist rot) und DAPI-Kanal (Kernnachweis ist blau). MMS-Signale werden durch Kolokalisation mit DAPI-Kernnachweis (blau) bestätigt. (D) In der Durchlichtaufnahme der scheintransplantierten Mausleber sind keine braunen Zellen zu sehen; DAB färbt spezifisch humanes Albumin.

4.8.2 Genetische Charakterisierung von Typ I Zellen

Zur Klärung des genetischen Ursprungs der Typ I Zellen wurden Lebern untersucht, die CM-DiI-markierten Zellen enthielten. Bei der Kombination von ISH und IHC wurde in diesem Fall auf den Einsatz MMS-Sonde verzichtet, da diese wie auch CM-DiI rot fluoresziert

und so leicht zu Verwechslungen führen kann. Wie in Abbildung 20 dargestellt wurden in den Präparaten CM-DiI-positive Konglomerate mit der Morphologie von Typ I Zellen gefunden. In der IHC stellten sich diese Konglomerate positiv für humanes Albumin dar. In der ISH auf demselben Schnitt wurden in den Arealen Alu-positive Kerne gefunden. Allerdings waren nicht alle Kerne der CM-DiI-positiven Zellen auch Alu-positiv.

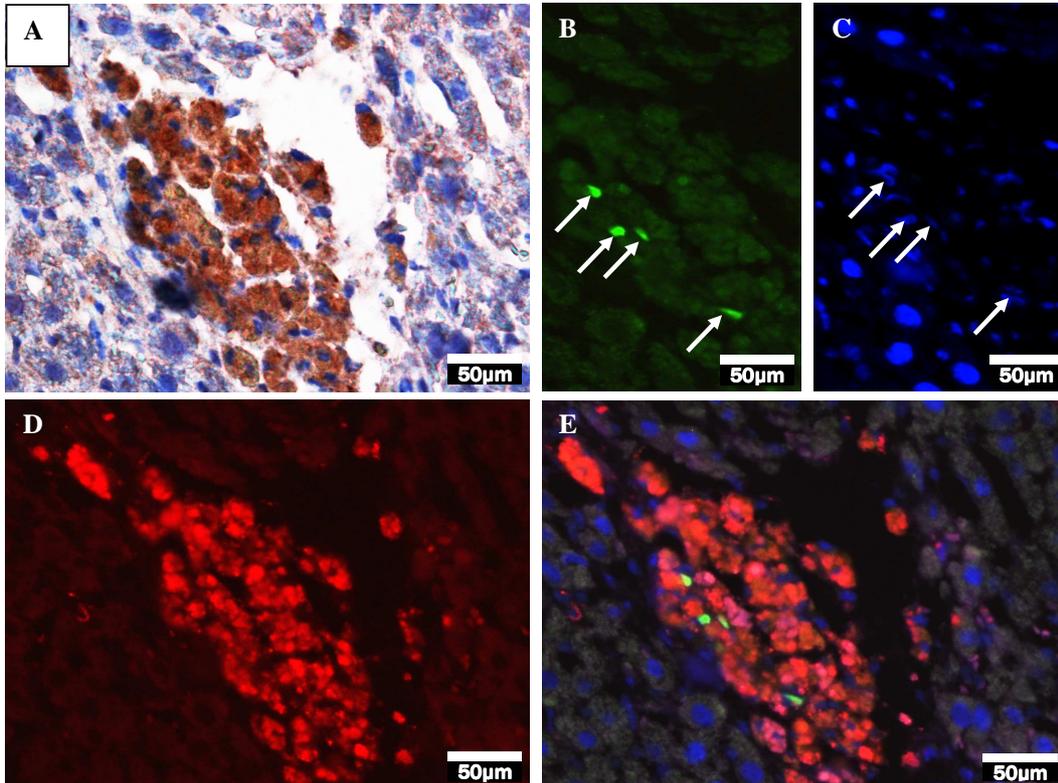


Abbildung 20: Kombination von Alu ISH und IHC auf humanes Albumin an einer Mausleber 21 d nach Transplantation von CM-DiI-markierten Nabelschnur Stammzellen. (A) Durchlichtaufnahme, humanes Albumin ist braun (DAB), Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun. Eine Gruppe von 20-30 Humanalbumin-positiven Typ I Zellen liegt im Leberparenchym. (B) Cy2-Kanal, Alu-Sonde ist grün, im entsprechenden Areal aus (A) liegen Alu-positive Strukturen (weiße Pfeile). (C) DAPI-Kanal, DAPI-Kernnachweis ist blau, den Alu-positiven Strukturen können Kerne zugeordnet werden (weiße Pfeile). (D) Cy3-Kanal, CM-DiI ist rot, die Typ I Zellen sind CM-DiI-positiv. (E) Im Fusionsbild werden die Alu-positiven Kerne im CM-DiI-positiven Areal kolokalisiert. Mit der Kombination der Alu-ISH und der IHC auf humanes Albumin können Humanalbumin-positive Typ I Zellen mit Alu-positivem Kern nachgewiesen werden.

4.8.3 Genetische Charakterisierung von Typ II Zellen

Zur genetischen Charakterisierung wurden Folgeschnitte von Präparaten gewählt, in denen zuvor mittels IHC häufig Typ II Zellen detektiert wurden. Diese mit der Kombination aus ISH

und IHC bearbeitet und mikroskopisch ausgewertet. In den Durchlichtaufnahmen zeigten sich Humanalbumin-positive Zellen, von denen im Cy2- und Cy3-Kanal weitere Aufnahmen gemacht wurden. Alu-positive Strukturen wurden in der Umgebung der Typ I Zellen nicht gefunden. Im Fusionsbild konnte den Humanalbumin-positiven Typ II Zellen jedoch ein MMS-positiver Kern zugeordnet werden (siehe Abbildung 21).

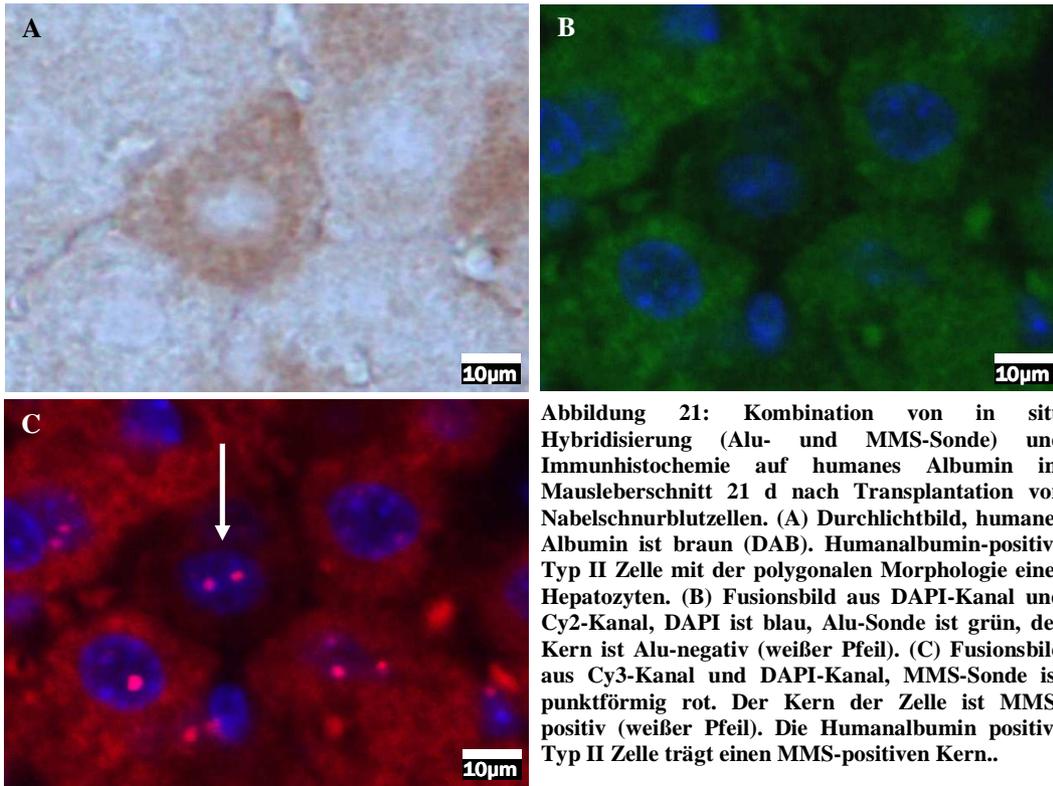


Abbildung 21: Kombination von in situ Hybridisierung (Alu- und MMS-Sonde) und Immunhistochemie auf humanes Albumin im Mausleberschnitt 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen. (A) Durchlichtbild, humanes Albumin ist braun (DAB). Humanalbumin-positive Typ II Zelle mit der polygonalen Morphologie eines Hepatozyten. (B) Fusionsbild aus DAPI-Kanal und Cy2-Kanal, DAPI ist blau, Alu-Sonde ist grün, der Kern ist Alu-negativ (weißer Pfeil). (C) Fusionsbild aus Cy3-Kanal und DAPI-Kanal, MMS-Sonde ist punktförmig rot. Der Kern der Zelle ist MMS-positiv (weißer Pfeil). Die Humanalbumin positive Typ II Zelle trägt einen MMS-positiven Kern..

5 Diskussion

5.1 Aktuelle Studien zur Transplantation von Stammzellen in die Leber von Versuchstieren

Der Einsatz von humanen Hepatozyten bietet ein breites Spektrum an Möglichkeiten in Forschung, Pharmakologie und Klinik. Durch die begrenzte Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten kann ihr Potential derzeit jedoch nicht voll ausgeschöpft werden (Nussler *et al.* 2006; Hengstler *et al.* 2005). Um den hohen Bedarf an Hepatozyten zu decken, liegt die Generierung von Hepatozyten im Interesse vieler Arbeitsgruppen, wobei verschiedene Strategien verfolgt wurden. Ein Ansatzpunkt ist es, Hepatozyten *in vitro* zur Teilung anzuregen. Obwohl die für die Regeneration verantwortlichen Cytokine weitestgehend bekannt sind, ist es bis dato nicht gelungen, Hepatozyten *in vitro* effektiv zur Proliferation anzuregen (Michalopoulos & DeFrances 1997; Michalopoulos & DeFrances 2005; Brulport *et al.* 2007). Auch die Differenzierung von Hepatozyten aus leberständigen Vorläuferzellen, sog. Oval-Zellen, ist bislang nicht gelungen (Brulport *et al.* 2007; Petersen *et al.* 1999). Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Differenzierung von Hepatozyten aus extrahepatischen Stammzellen. Von Ruhnke *et al.* ist eine Methode beschrieben, mit der aus peripheren Blutmonozyten durch ein zweistufiges Schema (Dedifferenzierung und anschließende Differenzierung) *in vitro* Hepatozyten-ähnlichen Zellen generiert werden können. Die so differenzierten Zellen werden als Neohepatozyten bezeichnet (Ruhnke *et al.* 2005a). Stoffwechselleistungen wie Harnstoffproduktion, Glucoseumsatz, Albuminsekretion und Uridindiphosphat-Glycosyltransferase-Aktivität der Neohepatozyten Zellen waren *in vitro* mit kultivierten Hepatozyten vergleichbar. Auch konnte mit Rifampicin eine Induktion von CYP3A4 nachgewiesen werden (Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b). Neohepatozyten exprimieren somit wichtige Markerproteine von Leberzellen, sind in der Lage, leberzellspezifische Stoffwechselleistungen zu übernehmen und verfügen über einen induzierbaren Fremdstoffmetabolismus (Phase I und II).

Zur Untersuchung des Differenzierungspotenzials von humanen Stamm- und Vorläuferzellen *in vivo* wurden diese von unterschiedlichen Arbeitsgruppen in Lebern von Nagetieren transplantiert, einen Überblick der zusammengefassten Ergebnisse bietet Tabelle 8. Bei

xenogenen Transplantationen ist mit starken Immunproblemen zu rechnen. Selbst die bereits etablierte, allogene Inselzelltransplantation zur Therapie des Diabetes Mellitus Typ I ist nur unter Immunsuppression möglich (Nussler *et al.* 2006). Bei xenogenen Transplantationsstudien ist durch die unterschiedlichen Spezies eine noch stärkere Immunreaktion zu erwarten. Um bei der Transplantation von humanen Zellen in Lebern von Mäusen Immunproblemen vorzubeugen wurden als Versuchstiere von den meisten Arbeitsgruppen immundefiziente SCID- oder NOD/SCID-Mäuse gewählt. Weiterhin kann es bei xenogenen Transplantationen zu einer Speziesinkompatibilität von Signalwegen kommen. Murine Wachstumsfaktoren und Mediatoren, durch die eine Transdifferenzierung gesteuert wird, entfalten unter Umständen an den Rezeptoren der humanen Zellen nicht ihre volle Wirkung. Eine nach xenogener Transplantation nachgewiesene Transdifferenzierung weist jedoch stark darauf hin, dass diese auch nach allogener Transplantation stattfinden kann (Hengstler *et al.* 2005). Um die Regeneration anzuregen, wurden die Lebern der Nagetiere zum Teil durch chemische (CCl₄, *Tetrachlorkohlenstoff*) oder strahlenbedingte Reize vorgeschädigt. Die humanen Stamm- und Vorläuferzellen wurden über die Milz, über die Pfortader und Schwanzvene oder direkt ins Gewebe appliziert. Trotz der unterschiedlichen Vorgehensweisen bei der Transplantation und der verschiedenen Zelllinien stimmten die Ergebnisse der Studien in weiten Teilen überein. In allen 14 Studien konnten nach Transplantation die Differenzierungsmarker humanes Albumin oder HePar1 Antigen nachgewiesen werden. Auffällig war die Übereinstimmung in der Morphologie der HePar1- und Humanalbumin-positiven Zellen, trotz der variablen Studienbedingungen (Brulport *et al.* 2007). Trotz der weitgehenden Übereinstimmung der Ergebnisse wurden diese sehr unterschiedlich bewertet (Nussler *et al.* 2006; Hengstler *et al.* 2005). Sehr optimistisch wurde von einigen Arbeitsgruppen der Nachweis von Hepatozytenmarkern als Hinweis auf eine vollständige Differenzierung der transplantierten Zellen zu funktionsfähigen Hepatozyten interpretiert (Newsome *et al.* 2003; Schwartz *et al.* 2002; Kogler *et al.* 2004; Ishikawa *et al.* 2003). Jedoch stehen Studien zum Nachweis der Stoffwechselaktivität und anderen Funktionsparametern der *in vivo* differenzierten Zellen noch aus (Hengstler *et al.* 2005). Andere Arbeitsgruppen sprachen zurückhaltender von einer Teildifferenzierung und von Hepatozyten-ähnlichen Zellen, da lediglich einige Hepatozytenmarker nachgewiesen werden konnten (Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b; Brulport *et al.* 2007). Zudem stellt sich die Frage, ob die Humanalbumin- bzw. HepPar1-positiven Zellen durch Transdifferenzierung,

Fusionierung oder andere Mechanismen entstehen. Anhand des FAH^{-/-}-Modells konnten drei unabhängige Arbeitsgruppen Zellfusion zwischen murinen Hepatozyten und transplantierten Zellen nachweisen (Vassilopoulos *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003a; Wang *et al.* 2003b; Willenbring *et al.* 2004). Bei allen drei Arbeitsgruppen wurden jedoch Zellen murinen Ursprungs transplantiert. Newsome untersuchte murine Lebern nach Transplantation von mononukleären Zellen aus humanem Nabelschnurblut mittels ISH (*in situ* Hybridisierung) auf Zellfusion, es ergab sich jedoch kein Hinweis auf diesen Entstehungsmechanismus (Newsome *et al.* 2003). Ob humane Stamm- und Vorläuferzellen über ein Fusionspotential verfügen, ist bis dato ungeklärt.

Tabelle 8: Zusammenfassung der veröffentlichten Studien zur Transplantation von humanen Stamm- und Vorläuferzellen in die Lebern von Mäusen

Transplantierte Zellen	Zellzahl und Ort	Leberschaden	Ergebnisse
Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen (Beerheide <i>et al.</i> 2002)	2 x 10 ⁵ Zellen direkt ins Lebergewebe	keiner	Expression von humanem Albumin 7d und 21d nach Transplantation (IHC, RT-PCR), keine Expression von α -Fetoprotein und GATA4 (RT-PCR)
Lin ⁻ CD38 ⁻ CD34 ⁻ ClqR _p ⁺ und Lin ⁻ CD38 ⁻ D34 ⁺ ClqR _p ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut und Knochenmark (Danet <i>et al.</i> 2002)	500 to 7 x 10 ⁴ Zellen in die Schwanzvene	3.75 Gy	Expression von HepPar1 Antigen und humanem c-met 8-10 Wochen nach Transplantation (IHC), Nachweis von humanem Albumin (RT-PCR). In der suspendierten Mausleber konnten in geringem Maß HLA-ABC ⁺ und CD45 ⁺ Zellen nachgewiesen werden (Durchflußzytometrie)
Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut, (Newsome <i>et al.</i> 2003)	50 x 10 ⁶ Zellen in die Schwanzvene	2.5 Gy	Expression von HepPar1 Antigen (IHC) 4, 6 und 16 Wochen nach Transplantation in NOD/SCID-Mäuse, kein Nachweis von Zellfusion (FISH)
CD34 ⁺ oder CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD7 ⁻ Zellen aus Nabelschnurblut (Wang <i>et al.</i> 2003b)	2000 CD34 ⁺ oder 1 x 10 ⁵ CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , CD7 ⁻ Zellen in die Schwanzvene	3 Gy CCl ₄	Expression von humanem Albumin (WB, RT-PCR, IHC) 5 und 30 nach Leberschädigung. Nachweis von CK19 (RT-PCR). Negative Ergebnisse ohne Leberschädigung ohne CCl ₄
CD34 ⁺ Zellen aus Nabelschnur- und peripherem Blut (Kollet <i>et al.</i> 2003)	2 x 10 ⁵ Zellen in die Schwanzvene	3.75 Gy CCl ₄	Humanalbumin-positive Zellen vorzugsweise um Gallenwege (IHC, RT-PCR, WB) Zellen. Die Neutralisation des SDF-1 Rezeptors CXCR4 verhinderte das Anwachsen der Stammzellen, wohingegen es durch SDF-1 in die Mausleber verstärkt wurde.
Adhärent proliferierende Nabelschnurblutzellen (Kakinuma <i>et al.</i> 2003)	10 x 10 ⁶ Zellen in die Pfortader	2-AAF Teilhepatektomie	Expression von humanem Albumin (RT-PCR, IHC) und HepPar1 Antigen (IHC), humanes Albumin wurde im Serum gefunden (WB) und humane X-Chromosome in den Zentromeren (FISH)

Diskussion

CD34 ⁺ oder CD45 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (Ishikawa <i>et al.</i> 2003)	1 x 10 ⁵ Zellen in die Schwanzvene	5-Fluorouracil, Anti-Maus c-kit	Expression von humanem Albumin (RT-PCR), HepPar1 Antigen (IHC) und humanen Zentromeren (FISH)
Nestin-positive adhärenz proliferierende Inselvorläuferzellen (Von Mach <i>et al.</i> 2004)	0.15, 1.5, und 7.5 x 10 ⁵ direkt ins Lebergewebe	keine	Expression von humanem Albumin aber keine Expression (IHC, RT-PCR) 3 und 12 Wochen nach Transplantation nach von 1.5 and 7.5 x 10 ⁵ Zellen, jedoch kein Nachweis nach von 0.15 x 10 ⁵ Zellen
CD 34 ⁺ Zellen aus Nabelschnurblut (Turrini <i>et al.</i> 2004)	3-5 x 10 ⁵ Zellen bei der intra-fetalen und 15-20 Zellen bei der Blastozysten Transplantation	keine	Expression von humanem Albumin, HepPar1 Antigen und humanem α 1-Antitrypsin (IHC, RT-PCR), 1 und 4 Wochen nach Geburt
Neohepatozyten aus humanen Monozyten (Ruhnke <i>et al.</i> 2005a)	7.5 x 10 ⁵ Zellen direkt ins Lebergewebe	keine	Expression von humanem Albumin (IHC) 3 Wochen nach Transplantation
Adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen (Nonome <i>et al.</i> 2005)	5 x 10 ⁴ Zellen in die Schwanzvene	Fas-Ligand 1.5 Gy	Expression von humanem Albumin, HepPar1 Antigen und humanem α 1-Antitrypsin (IHC), Nachweis von humanem Albumin, α -Fetoprotein, Glutaminsynthetase und Transferrin (RT-PCR)
Mononukleäre Zellen aus humanem Nabelschnurblut (Sharma <i>et al.</i> 2005)	1 x 10 ⁶ Zellen in die Schwanzvene	2.5 Gy	Expression von humanem Albumin, jedoch keine Expression von humanem CK18 (IHC, RT-PCR) 4 Wochen nach Leberschädigung und 8 Wochen nach Transplantation
Vorbehandelte mesenchymale Stammzellen (Aurich <i>et al.</i> 2006)	1x 10 ⁶ Zellen in die Milz	keine	Expression von PCK1, Connexin32, humanes Albumin und HepPar1 Antigen (IHC)
Nestin-positive hepatopankreatische Vorläuferzellen (Eberhardt <i>et al.</i> 2006)	7.5 x 10 ⁵ Zellen direkt ins Lebergewebe	keine	Expression von humanem Albumin in Lebern von NOD/SCID-Mäusen (IHC, RT-PCR).

Ziel dieser Arbeit ist es, das Schicksal humaner Stamm- und Vorläuferzellen nach Transplantation in die Leber von immundefizienten NOD/SCID-Mäusen zu verfolgen. Als Vertreter der Stamm- und Vorläuferzellen wurden adhärenz proliferierende Nabelschnurblutzellen und aus peripheren Blutmonozyten generierte Neohepatozyten transplantiert. Mithilfe von Lebendzellfarbstoffmarkierung und ISH sollten die transplantierten Zellen identifiziert werden. Als ein leberzellspezifischer Faktor sollte die Expression humanen Albumins immunhistochemisch nachgewiesen werden. Um die genetische Identität der Humanalbumin-positiven Zellen zu ermitteln, wurden die IHC auf

humanes Albumin und die ISH zum Nachweis von menschlichem und murinem Kern an einigen Gewebeschnitten in Kombination eingesetzt.

5.2 Identifikation der transplantierten Zellen

Zur Untersuchung des Schicksals von Stamm- und Vorläuferzellen in der Leber eines Versuchstieres stellt die Wiedererkennung der transplantierten Zellen nach Explantation einen Meilenstein dar. Um die transplantierten Zellen im Gewebeschnitt zu identifizieren, wurden die verwendeten Zellen vor der Transplantation mit dem Fluoreszenzfarbstoff CM-Di1 markiert. Der Farbstoff wird in Kultur von den Zellen aufgenommen und emittiert bei spezifischer Anregung ein rotes Fluoreszenzsignal. Nach Explantation konnten die transplantierten Zellen direkt in den Leberschnitten detektiert werden. Die Zellen lagen einzeln im Gewebe und in Gefäßen oder sie traten dicht zusammengelagert in Zellverbänden auf. Die Identifikation der transplantierten Zellen ausschließlich anhand der Farbstoffmarkierung kann jedoch leicht zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Durch Zelluntergang von CM-DiI-markierten (*chloromethylbenzamido derivative of octadecylindocarbocyanine, Membranfarbstoff, rot*) Zellen nach Transplantation kann der Farbstoff ins Leberparenchym freigesetzt werden. Wirtszellen, die den freigesetzten Farbstoff aufnehmen, fluoreszieren durch Anregung ebenfalls rot und sind nicht von den transplantierten Zellen zu unterscheiden. Um die transplantierten Zellen mit hoher Sicherheit im murinen Gewebe zu identifizieren, sollte zusätzlich zur Farbstoffmarkierung der humane Ursprung durch den Nachweis menschlicher DNA gesichert werden (Schormann *et al.* 2008). Dazu wurden Alu-DNS-Sequenzen mittels ISH nachgewiesen. Alu-Sequenzen sind hochrepetitive, für Primaten spezifische DNS-Sequenzen (Styles & Brookfield 2007). In einigen Schnitten sollten zusätzlich murine Kerne mit der ISH dargestellt werden. Dazu wurde eine MMS-Sonde (*mouse major satellite*) verwendet. Die für das murine Genom spezifische und hochrepetitive MMS-Sequenz eignet sich zur Darstellung von Mausekernen (Brüstle *et al.* 1995; Brüstle *et al.* 1997; Schormann *et al.* 2008). Es wurde eine ISH etabliert, in der Menschekern mittels Alu-Sonde und Mausekern mittels in einem Ansatz sensitiv und speziesspezifisch nachgewiesen werden konnte. Mit der Farbstoffmarkierung und der genetischen Charakterisierung der Zellen stand eine sichere Methode zur Identifizierung der transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen zur Verfügung.

5.3 Identifikation der transplantierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation

Mit der oben beschriebenen Methode sollten transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen nach unterschiedlicher Verweildauer in der Leber von NOD/SCID-Mäusen identifiziert werden. Dazu wurden Neohepatozyten wie von Ruhnke beschrieben aus peripherem Blut von Erwachsenen generiert (Ruhnke *et al.* 2005a; Ruhnke *et al.* 2005b) und portal oder direkt parenchymal in die Leber von immundefizienten Mäusen transplantiert. Zu den Zeitpunkten 2 d, 21 d und 60 d nach Transplantation wurden die Lebern explantiert und mittels ISH auf Alu-positive Kerne untersucht. Die Anzahl der detektierten Alu-positiven Kernen hängt stark von der Position des Gewebeschnittes innerhalb der Leber ab. Daraus folgt eine starke Variation der detektierten Alu-positiven Kerne zwischen den einzelnen Versuchstieren und zwischen verschiedenen Schnitten aus einem Versuchstier. Die Analysen sind daher als semiquantitativ einzustufen und eignen sich nicht für statistische Zwecke. Jedoch eignet sich diese Analyse, um stark ausgeprägte Trends darzustellen.

Die Anzahl der Alu-positiven Strukturen war unter den beiden Transplantationsmodi vergleichbar, sodass keine Überlegenheit einer Methode nachgewiesen werden konnte. Unabhängig vom Transplantationsmodus war jedoch folgende Entwicklung zu erkennen. Zum frühen Zeitpunkt 2 d nach Transplantation zeigte sich ein Maximum der Alu-positiven Kerne. Bis zum Zeitpunkt 21 d nach Transplantation hatte die Anzahl der Alu-positiven Kerne rapide abgenommen. Eine Erklärung dafür bietet das murine Abwehrsystem. Zwar wurden, um die Immunreaktion der Empfänger möglichst gering zu halten, immundefiziente NOD/SCID-Mäuse als Versuchstiere gewählt jedoch ist die Abwehr dieser Tiere nicht vollkommen unterdrückt. Die Transplantation von humanen Zellen in eine NOD/SCID-Maus ist als eine xenogene Transplantation anzusehen. Es ist anzunehmen, dass die speziessfremden Zellen einen so starken antigenen Reiz darstellen, dass sie trotz der Immunschwäche als fremd erkannt und bekämpft werden. Die Folge ist ein starker Rückgang der transplantierten Zellen. 60 d nach Transplantation wurden zwar CM-DiI-positive Zellen gefunden, jedoch keine Alu-positiven Kerne. Um nicht nur durch Ausschluss zu zeigen, dass die CM-DiI-positiven Zellen einen Mausekern tragen, wurden in den Schnitten mittels MMS- und Alu-Sonde Mausekern und Menschekern nachgewiesen. In Leberschnitten 60 d nach Transplantation stellten sich CM-DiI-positive Zellen negativ für Alu-Sonde aber MMS-positiv dar. Es ist anzunehmen, dass es sich

bei den CM-DiI-positiven Zellen mit Mausekern um Wirtszellen handelt, die den CM-DiI-Farbstoff zugrunde gegangener transplantierte Zellen aufgenommen haben. Alu-positiv Kerne wurden nicht nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass nahezu alle transplantierte Zellen zugrundegegangen sind. Verantwortlich hierfür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die murine Abwehr und die suboptimalen Lebensbedingungen in der spezieffremden Mikroumgebung.

Vergleichend zu den Neohepatozyten sollten adhären proliferierende Nabelschnurblutstammzellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation in die Leber von NOD/SCID-Mäusen analysiert werden, wobei bei diesem Versuch die frühen Zeitpunkte von besonderem Interesse waren. Es wurden adhären proliferierende, CM-DiI-markierte Nabelschnurblutzellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen injiziert. Die Lebern wurden zu den Zeitpunkten 4 h, 12 h, 24 h, 5 d und 21 d nach Transplantation explantiert und mittels Alu-ISH auf Menschkerne untersucht. Die semiquantitative Analyse der ISH zeigt einen deutlichen Anstieg der Alu-positiven Kerne zwischen den Zeitpunkten 4 h bis 24 h (siehe Punkt 4.3.1). Korrespondierend zu den Neohepatozyten wird ein frühes Maximum erreicht. Auch hier wurde im Folgenden ein deutlicher Rückgang der Alu-positiven Kerne beobachtet. Der überraschende Anstieg bis zum Zeitpunkt 24 h nach Transplantation kann durch Umverteilung im Gewebe erklärt werden. Die ISH erfasst stets nur Zellen aus einer Ebene, was diese Methode anfällig für Umverteilungsvorgänge macht. Die injizierten Zellen liegen unmittelbar nach der Transplantation in einem relativ kleinen Areal und werden abhängig von der Schnittführung zum Teil nicht erfasst. Im Weiteren verteilen sie sich in kleine Gefäße und ins Lebergewebe (siehe Abbildung 6 und Abbildung 10 A-C) und werden nun in der Auswertung erfasst. Ab dem Zeitpunkt 24 h nach Transplantation nimmt die Anzahl der detektierten Zellen ab. Der kontinuierliche Abfall bis zum Zeitpunkt 21 d nach Transplantation stellt wahrscheinlich eine tatsächliche Abnahme der intakten transplantierte Zellen dar. Es ist anzunehmen, dass für das Absterben der transplantierte Zellen, analog zu den Neohepatozyten, immunologische Abstoßungsphänomene verantwortlich sind. Die Mausleber scheint keine idealen Lebensbedingungen für transplantierte humane Stamm- und Vorläuferzellen zu bieten. Nach Transplantation beider Stammzelllinien konnte trotz eines starken Rückgangs der transplantierte Zellen einige Zellen detektiert und mittels ISH genetisch als humane Zellen charakterisiert werden.

Zur genaueren quantitativen Analyse wurden in der Arbeitsgruppe Gewebestücke der Mauslebern mittels Duplex-PCR untersucht (Brulport *et al.* 2007). Mit dieser Methode konnte menschliche DNS in den Mauslebern quantitativ exakt erfasst werden. Da mit der Duplex-PCR DNS aus größeren Gewebestücken erfasst wird, spielen Umverteilungsvorgänge der transplantierten Zellen bei der quantitativen Analyse eine geringere Bedeutung. Die Menge der gemessenen DNS war im Rahmen der Bestimmung bis 24 h nach Transplantation konstant. Korrespondierend zu der Analyse mittels ISH wurden in der Duplex-PCR 21 d nach Transplantation eine Abnahme der humanen DNS beobachtet (Brulport *et al.* 2007).

Die beiden verwendeten Zelllinien glichen sich in Morphologie und der Lage, in der sie im Leberparenchym detektiert wurden. Zu den frühen Zeitpunkten bis 5 d nach Transplantation wurden in den Lebern starke Läsionen im Lebergewebe gefunden, in denen die charakteristischen runden Kerne der Maushepatozyten nicht sichtbar waren. Hierbei handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um transplantationsbedingte Verletzungen. Diese sind im beschriebenen Versuch erwünscht, da Verletzungen der Leber die Regeneration anregen und Differenzierung der transplantierten Zellen zuträglich sein kann (Hengstler *et al.* 2005; Brulport *et al.* 2007). Zu den frühen Zeitpunkten 4 h - 5 d wurden Alu-positive Zellen in den nekrotischen Arealen gefunden, andere wurden in angrenzenden Gefäßen und vor allem ab 24 h nach Transplantation auch im Parenchym gefunden. Zum späten Zeitpunkt von 21 d wurden Gruppen von Alu-positiven Nabelschnurblutzellen in CM-DiI-positiven Arealen gefunden. Die Konglomerate der CM-DiI-positiven Zellen lagen im Gewebe integriert. Die Alu-positiven Kerne waren oval-gebogen und kleiner als die umliegenden Maushepatozyten. 21 d nach Transplantation von Neohepatozyten wurden Alu-positive Kerne umgeben von schmalen Alu-negativen Zellkernen gefunden. In der HE-Färbung von Nachbarschnitten stellten sich diese Areale als bindegewebsreich, mit fibroblastenartigen Zellen dar. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um Narbengewebe der oben beschriebenen transplantationsbedingten Gewebsverletzungen handelt, in dem sich Neohepatozyten eingenistet haben. Bei beiden untersuchten Zelllinien waren bereits ab den frühen Zeitpunkten viele transplantierte Zellen in die Endothelschicht integriert. Einige dieser Zellen hatten längliche Kerne, vergleichbar mit den umliegenden Endothelzellen. In der Arbeitsgruppe wurden solche Zellen mit einer Kombination aus Alu-ISH und Solanum tuberosum Lectin Färbung untersucht. Mit dieser Färbung lassen sich Endothelzellen zuverlässig darstellen. Die Ergebnisse zeigten Unterschiede im Färbemuster der Endothelzellen und der endothel-

ähnlichen Alu-positiven Zellen (Brulport *et al.* 2007). Die Interpretation, dass sich die Stamm- und Vorläuferzellen zu Endothelzellen differenziert haben, ist sehr interessant, jedoch mit großer Vorsicht zu behandeln. Die Differenzierung zu Endothelzellen war nicht Thema der vorliegenden Arbeit. Tiefere Untersuchungen, wie z.B. die Expression von CD31, zur Beurteilung eines Differenzierungspotentials zu Endothelzellen stehen noch aus.

5.4 Immunhistochemischer Nachweis humanen Albumins als leberzellspezifischer Marker

Als Hinweis auf eine Differenzierung der transplantierten Zellen in Richtung Leberzelle sollte drei Wochen nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen humanes Albumin immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die IHC (Immunhistochemie) auf die Expression humanen Albumins wurde an humanen Leberschnitten etabliert. Zur methodischen Kontrolle wurden in einem weiteren Experiment humane Hepatozyten in den linken Leberlappen von NOD/SCID-Mäusen transplantiert. Mit dem Nachweis von Humanalbumin-positiven Zellen in Schnitten dieser Lebern wurde gezeigt, dass mit der IHC humanes Albumin auch in Mauslebern detektiert wird.

Durch transplantationsbedingte Verletzungen werden im Lebergewebe der Versuchstiere verschiedene Antigene freigelegt und es laufen Entzündungsreaktionen ab. Immunhistochemische Färbungen zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation zeigten häufig falsch-positive Ergebnisse, die wahrscheinlich durch die Gewebereaktion bedingt sind. Um die Spezifität der angewandten Methode sicherzustellen, wurden bei jedem Färbegang scheintransplantierte Mauslebern als Negativkontrolle mitgefärbt. Die Stamm- und Vorläuferzellen wurden in einer Suspension aus Zellkulturmedium (William's Medium E) und FCS (*fetal calf serum*) transplantiert. Um einen Einfluss dieser Medien auszuschließen, wurden Scheintransplantationen mit diesen Einzelkomponenten durchgeführt. Zusätzlich wurde der Einfluss der Verletzung durch Volumenzunahme in der Leber durch Injektion von reinem NaCl in einem separaten Versuch untersucht. Die Anzahl der falsch-positiven Signale in den Negativkontrollen lag im Mittel bei 0,07 pro Schnitt. Wie bei der ISH beschrieben, eignen sich die quantitativen Analysen nicht für die streng statistische Auswertung. Mit 9 falsch-positiven Strukturen in 126 untersuchten Gewebeschnitten konnte allerdings gezeigt werden, dass sich humanes Albumin mit der IHC zuverlässig und mit hoher Spezifität

nachweisen lässt. In Kontrollfärbungen der adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen vor der Transplantation wurde kein humanes Albumin nachgewiesen. Die Neohepatozyten ließen sich nicht adhärent auf Objektträgern kultivieren. Ein immunhistochemischer Nachweis von Albumin konnte somit wie beschrieben nicht durchgeführt werden. Allerdings wurde von Ruhnke *et al.* der Mediumüberstand kultivierter Neohepatozyten auf sezerniertes humanes Albumin untersucht. Der Gehalt humanen Albumins war mit dem von humanen Hepatozyten Kontrollen vergleichbar (Ruhnke *et al.* 2005a, Ruhnke *et al.* 2005b). Es ist demnach davon auszugehen, dass die Neohepatozyten bereits vor der Transplantation humanes Albumin exprimieren. 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen bzw. Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen konnten Humanalbumin-positive Zellen in den Mauslebern nachgewiesen werden. Die transplantierten Zellen übernehmen demnach zumindest teilweise leberzellspezifische Aufgaben. Diese Ergebnisse decken sich mit denen vieler anderer Studien (siehe Punkt 5.1 und Tabelle 8) und kann als starker Hinweis auf eine zumindest partielle Differenzierung der transplantierten Zellen in Richtung Hepatozyten gewertet werden. Die hier untersuchten Humanalbumin-positiven Zellen traten in charakteristischer Form und Lage auf und wurden davon ausgehend in zwei Typen eingeteilt und jeweils näher untersucht.

5.4.1 Humanalbumin-positive Typ I Zellen

Bei der Untersuchung der mit Nabelschnurblutzellen oder Neohepatozyten transplantierten Lebern von immundefizienten Mäusen mit IHC auf humanes Albumin wurden Humanalbumin-positive Zellen mit charakteristischen morphologischen Merkmalen beobachtet. Diese Zellen wurden als Typ I Zellen bezeichnet. Die Humanalbumin-positiven Typ I Zellen waren kleiner als die umliegenden Hepatozyten und hatten einen oval-gebogenen, häufig randständigen Zellkern, der in der Mayers-Hämalaun-Färbung sehr chromatindicht erschien. Das Kern-Zytoplasma-Verhältnis war im Vergleich zu Hepatozyten zugunsten des Zytoplasmas verschoben. Typ I Zellen traten meist in Zellverbänden von 5 bis 15 dicht beieinander liegenden Zellen auf. Diese Zellkonglomerate lagen entweder ins Gewebe integriert (Typ Ia) oder in kleinen Gefäßen (Typ Ib), deren Lumen sie ganz oder teilweise ausfüllten (Brulport *et al.* 2007). Eine systematische Zuordnung im Leberläppchen konnte dabei nicht beobachtet werden.

Zur genaueren Charakterisierung der Typ I Zellen wurden diese mit histologischen Standardfärbungen auf Speicherung von Stoffwechselprodukten untersucht. Zum Auffinden der Typ I Zellen in den gefärbten Schnitten wurde sich ihr Auftreten in größeren Zellkonglomeraten zu Nutze gemacht. Diese Konglomerate wurden in ihrer dreidimensionalen Ausbreitung im Lebergewebe bei der Herstellung der 2 µm dicken Gewebeschnitte mehrmals angeschnitten. Nach immunhistochemischer Darstellung von humanem Albumin wurden die positiven Typ I Zellen in einem benachbarten, histologisch gefärbten Schnitt anhand ihrer Lage und charakteristischen Form identifiziert. Die benachbarten Gewebeschnitte wurden mit der PAS-Färbung und der Berliner Blau Färbung untersucht. Mit der PAS-Färbung wird kein spezifisches Antigen detektiert, sondern reduzierbare Verbindungen dargestellt. In Leberzellen wird die PAS-Färbung als Hinweis auf die Speicherung von Glykogen als eine reduzierbare Kohlenhydratverbindung verwendet (Brulport *et al.* 2007). Jedoch ist zu beachten, dass neben Glykogen auch neutrale Mukopolysaccharide, Glykoproteine, und Phospholipide positiv reagieren können. Außer Hepatozyten können auch Makrophagen PAS-positiv sein (Lepidi *et al.* 2003). Bei der Detektion von PAS-positiven Zellen im beschriebenen Modell gehen wird jedoch von einer Glycogenspeicherung analog zu Hepatozyten ausgegangen.

In den untersuchten Schnitten wurden PAS-positive Zellen dargestellt, die morphologisch und anhand ihrer Position als Typ I Zellen identifiziert wurden. Die Nabelschnurblutzellen waren vor der Transplantation PAS-negativ. PAS-positive Typ I Zellen kann als Hinweis gedeutet werden, dass die Nabelschnurblutzellen mit der Speicherung von Glykogen eine weitere Aufgabe von Leberzellen übernehmen. Schnitte, in denen das Vorkommen von Typ I Zellen zu erwarten war, wurden außerdem mit der Berliner Blau Färbung untersucht. In der Berliner Blau Färbung wird Eisen blau gefärbt. In den Schnitten stellten sich blaue Zellen dar, die in ihrer Größe und Ausdehnung und Lokalisation Typ I Zellen entsprechen. Im Zuge der transplantationsbedingeten Verletzungen kam es zu Einblutungen in das Leberparenchym. Eisenspeichernde Typ I Zellen könnten durch die Aufnahme und Speicherung des Eisens aus dem Hämoglobin der Erythrozyten entstehen. In den scheintransplantierten Mäusen wurden keine eisenpositiven Zellen gefunden, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass die Eisenspeicherung von den transplantierten die Typ I Zellen vollzogen wird.

Zur Klärung der genetischen Identität der Humanalbumin-positiven Typ I und II Zellen wurde eine Methode zum kombinierten Nachweis von Alu- und MMS-Sequenzen mittels ISH und

humanem Albumin mittels IHC an einem Schnitt etabliert. Hiermit war es möglich zu differenzieren, ob die Humanalbumin-positiven Zellen einen menschlichen oder murinen genetischen Ursprung haben. In jedem Färbegang wurden eine humane Leber als Positivkontrolle und die Leber einer scheintransplantierten Maus als Negativkontrolle mitgefärbt. Wie bei der singular durchgeführten ISH wurde bei der Etablierung der Kombination der Färbetechniken eine auf eine sehr hohe Speziespezifität der Alu- und der MMS-Sonde geachtet. Bei der Auswertung der gefärbten Mausschnitte fiel jedoch auf, dass sich nicht jeder Mausekern MMS-positiv darstellte (siehe Abbildung 19). Die Kombination der ISH und der IHC erfordert viele Inkubations- und Waschschrte, die Gewebeschnitte werden zusätzlich großen Temperaturschwankungen ausgesetzt, wodurch das empfindliche Nachweissystem der MMS-Sonde eventuell gestört wird. In der vorliegenden Arbeit wurden mit der MMS-Sonde keine quantitativen, sondern qualitative Aussagen getroffen, daher wurden die Einbußen in der Sensitivität der MMS-Sonde in Kauf genommen.

Die Unterscheidung des MMS-Signals vom Membranfarbstoff CM-DiI in den kleinen, dicht beieinander liegenden Typ I Zellen ist ohne konfokale Mikroskopie sehr schwierig. Daher wurde in der Kombination von ISH und IHC zur Untersuchung von Typ I Zellen auf den Einsatz der MMS-Sonde verzichtet.

Bei der Untersuchung von Typ I Zellen mit der Kombination aus ISH und IHC wurde gezeigt, dass diese einen menschlichen Kern tragen und außerdem CM-DiI-positiv sind. Dies zeigt, dass Typ I Zellen direkt von den transplantierten Zellen abstammen. Ihre Entstehung kann durch partielle Differenzierung der transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen in der Mikroumgebung der Mausleber erklärt werden.

5.4.2 Humanalbumin-positive Typ II Zellen

Neben den Typ I Zellen wurde ein weiterer Typ an Humanalbumin-positiven Zellen beobachtet, der als Typ II Zelle bezeichnet wurde. Humanalbumin-positiv Typ II Zellen gleichen mit ihrer polygonalen Form exakt, sie tragen einen runden, zentral gelegenen Kern und sind von den umliegenden Maushepatozyten nur durch die Expression von humanem Albumin zu unterscheiden. Die Typ II Zellen wurden meist einzeln im Gewebe gefunden. Nach Transplantation von adhären proliferierenden Nabelschnurblutzellen fanden sich Typ II Zellen mit einem Anteil von 55% aller Humanalbumin-positiven Zellen. Nach

Transplantation von Neohepatozyten traten Typ II Zellen deutlich seltener auf. Dies könnte im Zusammenhang mit der transplantierten Zelllinie stehen oder mit der hohen Variabilität der Einzelerperimente in der semiquantitativen Analyse. Ob das Verhältnis von Typ I und II Zellen von der transplantierten Zelllinie abhängt kann nur die Analyse von weiteren Transplantationsstudien zeigen.

Sowohl von Kakinuma als auch in unserer Arbeitsgruppe wurden nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen immunhistochemisch HepPar-I-positive Zellen (*humanspezifisches Leberantigen*) nachgewiesen, die den Typ II Zellen morphologisch exakt gleichen (Kakinuma *et al.* 2003; Brulport *et al.* 2007). Dies gibt starke Hinweise auf die Expressierung eines weiteren leberzellspezifischen Markerproteins durch Typ II Zellen.

Zur genetischen Charakterisierung wurden Typ II mit dem kombinierten Nachweis von Alu-Sequenzen, MMS-Sequenzen und humanem Albumin untersucht. Interessanterweise wurde gezeigt, dass Humanalbumin-positive Typ II Zellen einen Mauskern tragen. Eine Transdifferenzierung aus den transplantierten Stamm- und Vorläuferzellen ist somit als Entstehungsmechanismus für Typ II Zellen unwahrscheinlich. Ebenso ist die Fusion von transplantierten Zellen mit Zellen murinen Ursprungs wenig wahrscheinlich, da in Typ II Zellen nie ein Mauskern und ein menschlicher Kern gemeinsam in einer Zelle nachgewiesen werden konnte. Die endgültige Aufklärung des Entstehungsmechanismus von Typ II Zellen war nicht Teil dieser Arbeit. Zu diskutieren ist ein horizontaler Gentransfer als eine Erklärung für die Entstehung von Humanalbumin-positiven Typ II Zellen mit einem murinen Kern (Brulport *et al.* 2007). Die Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation zeigten, dass die meisten Stammzellen in den ersten 21 d nach Transplantation untergehen. Leberzellen sind indes in der Lage, Plasmid-DNS ins Zytoplasma aufzunehmen und effektiv zu translatieren (Sebestyen *et al.* 2006; Zhang *et al.* 1999; Kusano *et al.* 2005; Liu *et al.* 1999). Die Aufnahme kann rezeptorvermittelt oder durch Poren und Risse in der Zellmembran stattfinden (Yakubov *et al.* 1989; Budker *et al.* 2000). Weiter ist beschrieben, dass Hepatozyten Apoptosekörperchen durch spezifische Rezeptoren erkennen und internalisieren können (Dini L. *et al.* 2002; McVicker *et al.* 2002). Zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation wurden in dieser Arbeit Alu-positive, DNS-haltige Partikel außerhalb von intakten Zellen beobachtet (siehe Abbildung 7). Diese Beobachtung könnte andeuten, dass Kernbruchstücke von zerfallenden transplantierten Zellen als Vehikel für humane DNS dienen (Brulport *et al.* 2007). Die Translation von humanen Genen in murinen Hepatozyten

könnte ein Entstehungsmechanismus für die Humanalbumin-positiven Typ II Zellen mit einem Mausekern sein. Zum horizontalen Gentransfer fähige Zellen wären von einem therapeutischen Standpunkt aus sehr interessant. In der Therapie von monogenetischen Lebererkrankungen könnten sie zur Bereitstellung von intakten Genen dienen (Brulport *et al.* 2007). Jedoch muss die Hypothese des horizontalen Gentransfers zwischen transplantierten und wirtseigenen Zellen durch tiefergehende Experimente erst noch bewiesen werden.

6 Zusammenfassung

In Klinik und Forschung besteht ein hoher Bedarf an humanen Hepatozyten. Diese werden u.a. für die Zelltransplantation bei Leberfunktionsstörungen und für Metabolismusstudien genutzt. Da Hepatozyten derzeit noch nicht *in vitro* kultiviert werden können, stehen sie nur begrenzt zur Verfügung. Es wird vielfach untersucht, ob sie sich aus Stamm- und Vorläuferzellen generieren lassen. *In vitro* gelang es Ruhnke *et al.* 2005 aus peripheren Monozyten Hepatozyten-ähnliche Zellen, sogenannte Neohepatozyten, zu differenzieren. Zur Beurteilung des vollen Differenzierungspotentials humaner Stamm- und Vorläuferzellen ist es wichtig diese *in vivo* zu untersuchen. In dieser Arbeit sollte die Entwicklung zwei Stammzelllinien an einem xenogenen Transplantationsmodell mit immundefizienten Mäusen untersucht werden. Als Transplantat dienten Neohepatozyten und Stammzellen aus humanem Nabelschnurblut.

Es wurden je 750.000 dieser Zellen in das Leberparenchym von NOD/SCID-Mäusen injiziert und die Lebern zu definierten Zeitpunkten nach Transplantation explantiert. Die Lokalisation der transplantierten Zellen gelang anhand des Membranfarbstoffs CM-DiI. Zur genauen Identifikation der transplantierten Zellen erfolgte eine genetische Charakterisierung von Mensch- und Mauskerne mittels *in situ* Hybridisierung. Die Gensonde zur Darstellung der Mauskerne (MMS-Sonde) wurde zuvor aus gereinigter Maus-DNS mittels PCR hergestellt. Anhand von CM-DiI und *in situ* Hybridisierung konnten die transplantierten Zellen sicher in den Gewebeschnitten identifiziert werden. Die transplantierten Zellen lagen integriert im Gewebe und im Randbereich kleinerer Gefäße, eine systematische Lokalisation im Leberläppchen war nicht zu erkennen. Im Weiteren wurde eine Immunhistochemie etabliert, die humanes Albumin in Mauslebern darstellt. Dieses lebezellspezifische Protein diente als Differenzierungsmarker der transplantierten Zellen. Interessanterweise wurden bei der Analyse beider Zelllinien zwei Typen Humanalbumin-positiver Zellen beobachtet: Typ I Zellen traten meist in Gruppen auf, waren kleiner als Hepatozyten und trugen einen dichten, dezentral gelegenen Kern. Mit histologischen Standardfärbungen konnte gezeigt werden, dass Typ I Zellen wie Hepatozyten in der Lage sind Glycogen und Eisen zu speichern. Der zweite Typ Humanalbumin-positiver Zellen, sogenannte Typ II Zellen, traten einzeln auf und glichen in ihrer Form exakt den Hepatozyten.

Durch die Kombination von Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung konnten die Humanalbumin-positiven Zellen genetisch charakterisiert werden. Die Kerne der Typ I Zellen waren positiv für primatenspezifische Alu-Sequenzen. Somit wurde ihr humaner Ursprung nachgewiesen. Ihre Entstehung kann durch Teildifferenzierung der humanen Stammzellen erklärt werden. Die Typ II Zellen wiesen einen MMS-positiven Mausekern auf. Ein möglicher Entstehungsmechanismus ist der horizontale Gentransfer nach Zerfall der transplantierten Zellen im Zuge der Immunreaktion. Der formale Nachweis eines solchen Phänomens steht noch aus.

Die Entstehung von Humanalbumin-positiven Zellen nach Transplantation von humanen Stammzellen in die Leber von immundefizienten Mäusen kann demnach durch Teildifferenzierung und möglicherweise horizontalen Gentransfer erklärt werden.

7 Literaturverzeichnis

Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J.M., Fike J.R., Lee H.O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S.J., Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* **425**, 968-973.

Aurich I., Mueller L.P., Aurich H., Luetzkendorf J., Tisljar K., Dollinger M.M. (2007) Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut*, **56**, 405–415.

Beerheide W., von Mach M.A., Ringel M., Fleckenstein C., Schumann S., Renzing N., Hildebrandt A., Brenner W., Jensen O., Gebhard S., Reifenberg K., Bender J., Oesch F., Hengstler J.G. (2002) Downregulation of beta2-microglobulin in human cord blood somatic stem cells after transplantation into livers of SCID-mice: an escape mechanism of stem cells? *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **294**, 1052-1063.

Bilir B.M., Guinette D., Karrer F., Kumpe D.A., Krysl J., Stephens J., McGavran L., Ostrowska A., Durham J. (2000) Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* **6**, 32-40.

Boehnisch Th., Farmilo A.J., Stead R.H., Key M., Welcher R., Harvey R., Atwood K.N. (2003) Immunhistochemische Färbungen, 3rd. edn. DakoCytomation GmbH.

Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Elsner C., Hammersen F.J., Walter Beerheide W., Spitkovsky D., Härtig W., Nussler A., Horn L.C., Edelmann J., Pelz-Ackermann O., Petersen J., Kamprad M., von Mach M., Lupp A., Zulewski H., Hengstler J.G. (2007) Fate of Extrahepatic Human Stem and Precursor Cells after Transplantation into Mouse Livers. *Hepatology* **46**, 861-870.

Brüstle O., Maskos U., McKay R. D. (1995): Host-guided migration allows targeted introduction of neurons into the embryonic brain. *Neuron*, **15**, 1275–1285.

Brüstle O., Spiro A. C., Karram K., Choudhary K., Okabe S., McKay R. D. (1997) In vitro-generated neural precursors participate in mammalian brain development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 14809–14814.

Budker V., Budker T., Zhang G., Subbotin V., Loomis A., Wolff J.A. (2000) Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med.* **2**, 76-88.

Burlina A.B. (2004) Hepatocyte transplantation for inborn errors of metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disorders* **27**, 373-383

Castell, J. V., Jover R., Martínez-Jiménez C. P., Gómez-Lechón M. J. (2006): Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2**, 183–212.

Danet G.H., Luongo J.L., Butler G., Lu M.M., Tenner A.J., Simon M.C., Bonnet D.A. (2002) C1qRp defines a new human stem cell population with hematopoietic and hepatic potential. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99**, 10441-10445.

Deutsche Stiftung Organtransplantation, Neu-Isenburg
<http://www.dso.de>, *Grafikpaket 11: Lebertransplantation*
(Stand: 25.03.2008)

Dini L., Pagliara P., Carla E.C. (2002) Phagocytosis of apoptotic cells by liver: a morphological study. *Microsc Res Tech*, **57**, 530-540.

Eberhardt M., Salmon P., von Mach M.A., Hengstler J.G., Brulport M., Linscheid P., (2006) Multipotential nestin and Isl-1 positive mesenchymal stem cells isolated from human pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 1167-1176.

Fisher R. A., Strom S. C. (2006) Human hepatocyte transplantation: worldwide results. *Transplantation* **82**, 441-449.

Gómez-Lechón M. J., Donato M. T., Castell J. V., Jover R. (2003): Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current drug metabolism* **4**, 292–312.

Gómez-Lechón M. J., Castell J. V., Donato M. T. (2008) An update on metabolism studies using human hepatocytes in primary culture. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **4**, 837-854.

Harris R.G. Bruscia E.M., Grove J.E., Van Arnam J.S., Krause D.S. (2004) Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science* **305**, 90-93.

Hengstler J.G., Van der Burg B., Steinberg P., Oesch F. (1999) Interspecies differences in cancer susceptibility and toxicity. *Drug Metab. Rev.* **31**, 917-970.

Hengstler J.G., Ringel M., Biefang K., Hammel S., Milbert U., Gerl M., Klebach M., Diener B., Platt K.L., Bottger T., Steinberg P., Oesch F. (2000a) Cultures with cryopreserved hepatocytes: applicability for studies of enzyme induction. *Chem.Biol.Interact.* **125**, 51-73.

Hengstler J.G., Utesch D., Steinberg P., Platt K.L., Diener B., Ringel M., Swales N., Fischer T., Biefang K., Gerl M., Bottger T., Oesch F. (2000b) Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev.* **32**, 81-118.

Hengstler J.G., Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Nussler A.K., Fandrich F., Ruhnke M., Ungefroren H., Griffin L., Bockamp E., Oesch F., von Mach M.A. (2005) Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **1**, 61-74.

Hsu S.M., Raine L., Fanger H. (1981) The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. *Am J Clin Pathology* **75**, 816-21.

Ishikawa F., Drake C.J., Yang S., Fleming P., Minamiguchi H., Visconti R.P., Crosby C.V., Argraves W.S., Harada M., Key L.L., Jr., Livingston A.G., Wingard J.R., Ogawa M. (2003) Transplanted human cord blood cells give rise to hepatocytes in engrafted mice. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **996**, 174-185.

Jang Y.Y., Collector M.I., Baylin S.B., Diehl A.M., Sharkis S.J. (2004) Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat.Cell Biol.* **6**, 532-539.

Kakinuma S., Tanaka Y., Chinzei R., Watanabe M., Shimizu-Saito K., Hara Y., Teramoto K., Arii S., Sato C., Takase K., Yasumizu T., Teraoka H. (2003) Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* **21**, 217-227.

Kogler G., Sensken S., Airey J.A., Trapp T., Muschen M., Feldhahn N., Liedtke S., Sorg R.V., Fischer J., Rosenbaum C., Greschat S., Knipper A., Bender J., Degistirici O., Gao J., Caplan A.I., Colletti E.J., Almeida-Porada G., Muller H.W., Zanjani E., Wernet P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J.Exp.Med.* **200**, 123-135.

Kollet O., Shvitiel S., Chen Y.Q., Suriawinata J., Thung S.N., Dabeva M.D., Kahn J., Spiegel A., Dar A., Samira S., Goichberg P., Kalinkovich A., Arenzana-Seisdedos F., Nagler A., Hardan I., Revel M., Shafritz D.A., Lapidot T. (2003) HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J.Clin.Invest* **112**, 160-169.

Kusano K.F., Pola R., Murayama T., Curry C., Kawamoto A., Iwakura A., Shintani S., Ii M., Asai J., Tkebuchava T., Thorne T., Takenaka H., Aikawa R., Goukassian D., von Samson P., Hamada H., Yoon Y.S., Silver M., Eaton E., Ma H., Heyd L., Kearney M., Munger W., Porter J.A., Kishore R., Losordo D.W. (2005) Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat.Med.* **11**, 1197-1204.

Lagasse E., Connors H., Al Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I.L., Grompe M. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat.Med.* **6**, 1229-1234.

Lee K.D., Kuo T.K., Whang-Peng J., Chung Y.F., Lin C.T., Chou S.H., Chen J.R., Chen Y.P., Lee O.K. (2004) In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* **40**, 1275-1284.

Lepidi H., Fenollar F., Gerolami R., Mege J.L., Bonzi M.F., Chappuis M., Sahel J., Raoult D. (2003) Whipple's disease: immunospecific and quantitative immunohistochemical study of intestinal biopsy specimens. *Hum.Pathol* **34**, 589-596.

Liu F., Song Y., Liu D. (1999) Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258-1266.

Liu X., Wu B., Szary J., Kofoed E.M., Schaufele F. (2007) Functional sequestration of transcription factor activity by repetitive DNA. *J Biol Chem.* **282**, 20868-76.

- Li A.P., Gorycki P.D., Hengstler J.G., Kedderis G.L., Koebe H.G., Rahmani R., de Sousa G., Silva J.M., Skett P. (1999) Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem.Biol.Interact* **121**, 117-123.
- Mazaris E. M., Roussos C.; Papalois V. E. (2005): Hepatocyte transplantation: a review of worldwide clinical developments and experiences. *Experimental and clinical transplantation: official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation* **3**, 306–315.
- McVicker B.L., Tuma D.J., Kubik J.A., Hindemith A.M., Baldwin C.R., Casey C.A. (2002) The effect of ethanol on asialoglycoprotein receptor-mediated phagocytosis of apoptotic cells by rat hepatocytes. *Hepatology* **36**,1478-1487.
- Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. (1997) Liver regeneration. *Science* **276**, 60-66.
- Michalopoulos G.K., DeFrances M.C. (2005) Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **93**,101-134.
- Mito M., Kusano M., Kawaura Y. (1992) Hepatocyte transplantation in man. *TransplantProc.* **24**, 3052-3053.
- Newsome P.N., Johannessen I., Boyle S., Dalakas E., McAulay K.A., Samuel K., Rae F., Forrester L., Turner M.L., Hayes P.C., Harrison D.J., Bickmore W.A., Plevris J.N. (2003) Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology* **124**, 1891-1900.
- Nonome K., Li X.K., Takahara T., Kitazawa Y., Funeshima N., Yata Y., Xue F., Kanayama M., Shinno E., Kuwae C., Saito S., Watanabe A., Sugiyama T. (2005) Human umbilical cord blood-derived cells differentiate into hepatocyte-like cells in the Fas-mediated liver injury model. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **289**, G1091-G1099.
- Nussler A., Konig S., Ott M., Sokal E., Christ B., Thasler W., Brulport M., Gabelein G., Schormann W., Schulze M., Ellis E., Kraemer M., Nocken F., Fleig W., Manns M., Strom S.C., Hengstler J.G. (2006) Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. *Journal of Hepatology* **45**, 144-159.
- Petersen B.E., Zajac V.F., Michalopoulos G.K. (1998) Hepatic oval cell activation in response to injury following chemically induced periportal or pericentral damage in rats. *Hepatology* **27**, 1030-8.
- Petersen B.E., Bowen W.C., Patrene K.D., Mars W.M., Sullivan A.K., Murase N., Boggs S.S., Greenberger J.S., Goff J.P. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* **284**, 1168-1170.
- Puppi J., Tan N., Mitry, R. R., Hughes R. D., Lehec S., Mieli-Vergani G., Karani J., Champion M. P., Heaton, N., Mohamed R., Dhawan A. (2008) Hepatocyte transplantation followed by auxiliary liver transplantation - a novel treatment for ornithine transcarbamylase deficiency. *American journal of transplantation* **2**, 452-457

Reder-Hilz B., Ullrich M., Ringel M., Hewitt N., Utesch D., Oesch F., Hengstler J.G. (2004) Metabolism of propafenone and verapamil by cryopreserved human, rat, mouse and dog hepatocytes: comparison with metabolism in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **369**, 408-417

Ringel M., von Mach M.A., Santos R., Feilen P.J., Brulport M., Hermes M., Bauer A.W., Schormann W., Tanner B., Schon M.R., Oesch F., Hengstler J.G. (2005) Hepatocytes cultured in alginate microspheres: an optimized technique to study enzyme induction. *Toxicology* **206**, 153-167.

Ruhnke M., Nussler A.K., Ungefroren H., Hengstler J.G., Kremer B., Hoeckh W., Gottwald T., Heeckt P., Fandrich F. (2005a) Human monocyte-derived neohepatocytes: a promising alternative to primary human hepatocytes for autologous cell therapy. *Transplantation* **79**, 1097-1103.

Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J.G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J.A., Soria B., Parwaresch R.M., Heeckt P., Kremer B., Fandrich F. (2005b) Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology* **128**, 1774-1786.

Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. (2002) Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J.Clin.Invest* **109**, 1291-1302.

Schormann W, Hammersen F.J., Brulport M., Hermes M., Bauer A., Rudolph C., Schug M., Lehmann T., Nussler A., Ungefroren H., Hutchinson J., Fändrich F., Petersen J., Wursthorn K., Burda M.R., Brüstle O., Krishnamurthi K., von Mach M., Hengstler J.G. (2008) Tracking of human cells in mice. *Histochem Cell Biol.* **130**, 329-38.

Sebestyen M.G., Budker V.G., Budker T., Subbotin V.M., Zhang G., Monahan S.D., Lewis D.L., Wong S.C., Hagstrom J.E., Wolff J.A. (2006) Mechanism of plasmid delivery by hydrodynamic tail vein injection. I. Hepatocyte uptake of various molecules. *J Gene Med.* **8**, 852-73.

Sharma A.D., Cantz T., Richter R., Eckert K., Henschler R., Wilkens L., Jochheim-Richter A., Arseniev L., Ott M. (2005) Human cord blood stem cells generate human cytokeratin 18-negative hepatocyte-like cells in injured mouse liver. *Am Journal of Pathology* **167**, 555-564.

Streyer L. (1995) Biochemie, Vierte Ausgabe edn. Spektrum Akademischer Verlag.

Strom S.C., Fisher R.A., Rubinstein W.S., Barranger J.A., Towb R.B., Charron M., Miele L., Pizarov L.A., Dorko K., Thompson M.T., Reyes J. (1997a) Transplantation of human hepatocytes. *Transplant.Proc.* **29**, 2103-2106.

Strom S.C., Fisher R.A., Thompson M.T., Sanyal A.J., Cole P.E., Ham J.M., Posner M.P. (1997b) Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* **63**, 559-569.

Styles P., Brookfield J.F. (2007) Analysis of the features and source gene composition of the AluYg6 subfamily of human retrotransposons. *BMC Evol Biol.* **7**, 102.

Theise N.D., Badve S., Saxena R., Henegariu O., Sell S., Crawford J.M., Krause D.S. (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* **31**, 235-240.

Turrini P., Monego G., Gonzalez J., Cicuzza S., Bonanno G., Zelano G., Rosenthal N., Paolessa G., Laufer R., Padron J. (2005) Human hepatocytes in mice receiving pre-immune injection with human cord blood cells. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* **326**, 66-73.

Vassilopoulos G., Wang P.R., Russell D.W. (2003) Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature* **422**, 901-904.

von Mach M.A., Hengstler J.G., Brulport M., Eberhardt M., Schormann W., Hermes M., Prawitt D., Zabel B., Grosche J., Reichenbach A., Muller B., Weilemann L.S., Zulewski H.(2004) In vitro cultured islet-derived progenitor cells of human origin express human albumin in severe combined immunodeficiency mouse liver in vivo. *Stem Cells* **22**, 1134-1141.

Wang X., Ge S., McNamara G., Hao Q.L., Crooks G.M., Nolte J.A. (2003a) Albumin expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood* **101**, 4201-4208.

Wang X., Willenbring H., Akkari Y., Torimaru Y., Foster M., Al Dhalimy M., Lagasse E., Finegold M., Olson S., Grompe M. (2003b) Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* **422**, 897-901.

Willenbring H., Bailey A.S., Foster M., Akkari Y., Dorrell C., Olson S., Finegold M., Fleming W.H., Grompe M. (2004) Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nat. Med.* **10**, 744-748.

Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Rytte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. (1989) Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 6454-6458.

Zhang G., Budker V., Wolff J.A. (1999) High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum.Gene Ther.* **10**, 1735-1737.

Zhao Y., Glesne D., Huberman E. (2003) A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 2426-2431.

Deutsche Stiftung Organtransplantation, Neu-Isenburg
<http://www.dso.de>, *Grafikpaket 11: Lebertransplantation*
(Stand: 25.03.2008)

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nukleotidsequenz der mouse major satellite DNS	Seite 27
Abbildung 2: CM-DiI-markierte Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 32
Abbildung 3: Identifikation der transplantierten Zellen durch in situ Hybridisierung.....	Seite 33
Abbildung 4: Unspezifisch fluoreszierendes Artefakt.....	Seite 34
Abbildung 5: Positiv- und Negativkontrolle der in situ Hybridisierung.....	Seite 35
Abbildung 6: In situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 2 d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 37
Abbildung 7: Alu-positives Kernbruchstück 2 d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 38
Abbildung 8: In situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 21d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 39
Abbildung 9: In situ Hybridisierung mit Alu- und MMS-Sonde 60 d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Mausleber.....	Seite 40
Abbildung 10: In Situ Hybridisierung mit Alu-Sonde 24 h, 5 d und 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen in die Mausleber.....	Seite 43
Abbildung 11: Positiv- und Negativkontrolle der Immunhistochemie auf humanes Albumin.....	Seite 45
Abbildung 12: Immunhistochemische Detektion von humanem Albumin 21 d nach Transplantation primärer humaner Hepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 46
Abbildung 13: Immunhistochemische Detektion von humanem Albumin an adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen vor der Transplantation.....	Seite 47
Abbildung 14: Immunhistochemische Detektion von humanem Albumin 21 d nach Transplantation von Neohepatozyten in die Leber von NOD/SCID-Mäusen: Zwei Typen Humanalbumin-positiver Zellen..... (Auszüge veröffentlicht in Brulport et al 2007, Mitautorenschaft FJ Hammersen)	Seite 49
Abbildung 15: Immunhistochemische Detektion von Humanalbumin-positiven Typ I und II Zellen 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 51

Abbildung 16: Immunhistochemie auf humanes Albumin, PAS- und Berliner Blau-Färbung an Folgeschnittschnitten aus einer Mausleber 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen.....	Seite 52
Abbildung 17: PAS-Färbung 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 53
Abbildung 18: Berliner Blau Färbung 21 d nach Transplantation von Nabelschnurblutzellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 54
Abbildung 19: Positiv- und Negativkontrolle der Kombination von in situ Hybridisierung (Alu, MMS) und Immunhistochemie auf humanes Albumin.....	Seite 55
Abbildung 20: Darstellung von Humanalbumin-positiven Typ I Zellen mit einem Menschern mittels Kombination von Alu-In situ Hybridisierung und Immunhistochemie auf humanes Albumin..... (Auszüge veröffentlicht in Brulport <i>et al.</i> 2007, Mitautorenschaft FJ Hammersen)	Seite 56
Abbildung 21: Darstellung von Humanalbumin-positiven Typ II Zellen mit einem Mausern mittels Kombination von in situ Hybridisierung (Alu, MMS) und Immunhistochemie auf humanes Albumin..... (Auszüge veröffentlicht in Brulport <i>et al.</i> 2007, Mitautorenschaft FJ Hammersen)	Seite 57

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für PCR I zur Amplifikation der mouse major satellite Sequenz aus Maus-DNS.....	Seite 29
Tabelle 2: Pipettierschema für PCR II zur DIG-Markierung der mouse major satellite DNS.....	Seite 30
Tabelle 3: Anzahl der Alu-positiven Kerne in den Lebern von NOD/SCID-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von 750.000 aus mononukleären Zellen vordifferenzierte Neohepatozyten.....	Seite 36
Tabelle 4: Anzahl der Alu-positiven Kerne zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von 750.000 adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen in die Leber von NOD/SCID-Mäusen.....	Seite 41
Tabelle 5: Mit verschiedenen Medien scheintransplantierte Mäuse als Negativkontrollen.....	Seite 44
Tabelle 6: Humanalbumin-positiv Zellen in den Lebern von NOD/SCID-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation von 750.000 aus	

mononukleären Zellen vordifferenzierte Neohepatozyten.....	Seite 48
Tabelle 7: Quantitative Auswertung Humanalbumin-positiver Typ I und Typ II Zellen 21 d nach Transplantation von 750.000 adhärent proliferierenden Nabelschnurblutzellen in den linken Leberlappen von NOD/SCID- Mäusen.....	Seite 50
Tabelle 8: Zusammenfassung der veröffentlichten Studien zur Transplantation von humanen Stamm- und Vorläuferzellen in die Lebern von Mäusen..... (übersetzt und gekürzt aus Brulport <i>et al.</i> 2007, Mitautorenschaft FJ Hammersen)	Seite 60

9 Anhang

9.1 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

.....

Datum

.....

Unterschrift

9.2 Publikationen

Schormann W., Hammersen F.J., Brulport M., Hermes M., Bauer A., Rudolph C., Schug M., Lehmann T., Nussler A., Ungefroren H., Hutchinson J., Fändrich F., Petersen J., Wursthorn K., Burda M.R., Brüstle O., Krishnamurthi K., von Mach M., Hengstler J.G. (2008) **Tracking of human cells in mice.** *Histochem Cell Biol.* **130**, 329-338.

Brulport M., Schormann W., Bauer A., Hermes M., Elsner C., Hammersen F.J., Walter Beerheide W., Spitkovsky D., Härtig W., Nussler A., Horn L.C., Edelmann J., Pelz-Ackermann O., Petersen J., Kamprad M., von Mach M., Lupp A., Zulewski H., Hengstler J.G. (2007) **Fate of Extrahepatic Human Stem and Precursor Cells After Transplantation into Mouse Livers.** *Hepatology* **46**, 861-870.

9.3 Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. med. L-C. Horn und Prof. J. G. Hengstler für die Bereitstellung des interessanten Themas und die ausgezeichnete Betreuung in allen Phasen dieser Arbeit.

Für die fachlichen, organisatorischen Hilfen, die Einarbeitung im Labor sowie die angenehme, produktive Arbeitsatmosphäre gilt mein besonderer Dank Wiebke Schormann und Marc Brulport, sowie Matthias Hermes, Alexander Bauer, Carolin Elsner, Elke Navatril, Adelgunde Gräfe und Markus Schug.

Meiner Familie danke ich für die freundliche Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.