

Für meine Eltern und meine Familie

**Untersuchungen zur therapeutischen Anwendung mesenchymaler
Stammzellen bei chronischen Lebererkrankungen am Beispiel der Nicht-
alkoholischen Steatohepatitis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
Sandra Winkler

Geburtsdatum / Geburtsort: 03.12.1985 in Oschatz

angefertigt an / in: Universität Leipzig
Universitätsklinikum
Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-,
Thorax- und Gefäßchirurgie
Arbeitsgruppe Angewandte Molekulare
Hepatologie

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ
Dr. rer. nat. Corinna Dietel

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.12.2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 BIBLIOGRAPHISCHE BESCHREIBUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 CHRONISCHE LEBERERKRANKUNGEN MIT BESONDERER BETRACHTUNG DER NICHT-ALKOHOLISCHEN STEATOHEPATITIS (NASH)	2
2.2 PATHOMECHANISMUS DER NASH MIT BESONDERER BETRACHTUNG VON ORGANWECHSELWIRKUNGEN	2
2.2.1 THEORIEN ZUR PATHOGENESE DER NASH	2
2.2.2 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN LEBER UND FETTGEWEBE	4
2.2.3 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN LEBER UND IMMUNSYSTEM	6
2.2.4 WECHSELWIRKUNG ZWISCHEN LEBER UND DARM	8
2.3 TIERMODELLE DER NICHT-ALKOHOLISCHEN FETTLEBERERKRANKUNGEN (NAFLD)	10
2.3.1 ALLGEMEIN	10
2.3.2 PFP/RAG2 ^{-/-} MAUS MODELL	12
2.4 THERAPIE DER NASH MITTELS MESENCHYMALER STAMMZELLEN	13
2.4.1 CHARAKTERISTIKA MESENCHYMALER STAMMZELLEN	13
2.4.2 THERAPEUTISCHER EINSATZ VON MESENCHYMALER STAMMZELLEN	14
2.5 ZIELE DER PUBLIZIERTEN STUDIEN	15
3 PUBLIKATIONSMANUSKRIPTE	16
3.1 A METHIONINE-CHOLINE-DEFICIENT DIET ELICITS NASH IN THE IMMUNODEFICIENT MOUSE FEATURING A MODEL FOR HEPATIC CELL TRANSPLANTATION	16
3.2 HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS TOWARDS NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS IN AN IMMUNODEFICIENT MOUSE MODEL	28
4 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	47
5 ANLAGEN	51
5.1 LITERATURVERZEICHNIS	51
5.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	58
5.3 SUPPLEMENT	59
6 SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	62
7 LEBENS LAUF	63
8 PUBLIKATIONEN	64

8.1 ORIGINALARBEITEN	64
8.2 ÜBERSICHTSARTIKEL	64
8.3 BUCHKAPITEL	64
8.4 VORTRÄGE	64
8.5 POSTER-PRÄSENTATIONEN	65
8.6 AUSZEICHNUNGEN	68
9 DANKSAGUNG	70

1 Bibliographische Beschreibung

Winkler, Sandra

Untersuchungen zur therapeutischen Anwendung mesenchymaler Stammzellen bei chronischen Lebererkrankungen am Beispiel der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis

Universität Leipzig, Dissertation

75 S., 89 Lit., 4 Abb., 3 Anlagen

Referat

Die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH), gehörig zu der Gruppe der chronischen Lebererkrankungen als eine schwere Form der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD), nimmt in ihrer Prävalenz ständig zu. Gründe dafür sind u.a. eine gesteigerte Nahrungsaufnahme sowie Veränderungen der Nahrungszusammensetzung. Es kommt zur Ausbildung einer Steatose, die sich unter Mitwirkung verschiedener Einflussfaktoren zur Steatohepatitis weiterentwickeln kann, wobei die Pathogenese noch nicht genau verstanden ist. Die Nicht-alkoholische Steatohepatitis geht oft einher mit Insulinresistenz und starkem Übergewicht. Die Folgen für die Leber sind Funktionseinschränkungen und –verlust, hervorgerufen durch eine massive Akkumulation von Triglyzeriden in den Hepatozyten, Entzündungsprozesse sowie einem fibrotischen Umbau der Leber. Im fortgeschrittenen Stadium wird eine Lebertransplantation unausweichlich, die jedoch aufgrund des zunehmenden Mangels an Spenderorganen oft nicht möglich ist. Eine Alternative bietet die Transplantation mesenchymaler Stammzellen (MSC). MSC können *in vitro* in leberzellähnliche Zellen differenziert werden und weisen dabei essentielle hepatozytäre Eigenschaften auf, wodurch sie als möglicher Ersatz bzw. als Überbrückungstherapie bis zur Lebertransplantation in Frage kommen. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit dieser Fragestellung. Dazu wurde ein Tiermodell der NASH mittels Methionin-Cholin-defizienter Diät (MCD-Diät) etabliert und die Transplantation von hepatozytär differenzierten MSC durchgeführt. Anhand spezifischer zellulärer und biochemischer Marker der NASH konnte die Wirkung des Zelltransplantats auf die Empfängerleber analysiert werden. Es hat sich gezeigt, dass die MSC einen anti-inflammatorischen, anti-fibrotischen und pro-proliferativen Einfluss auf das Empfängerparenchym hatten und somit zur Verbesserung der Symptomatik der NASH beitrugen.

2 Einleitung

2.1 Chronische Lebererkrankungen mit besonderer Betrachtung der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis (NASH)

In Deutschland ist etwa jeder 16. Bürger von einer Erkrankung der Leber betroffen. Die Ursachen sind vielfältig. Dabei spielen akute Erkrankungen (Virushepatitiden, Intoxikation) und chronische Erkrankungen (Steatohepatitis, Zirrhose), Leberkrebs (HCC), Autoimmunerkrankungen (autoimmune Hepatitis) sowie genetisch bedingte chronische Erkrankungen (Alpha-1-Antitrypsinmangel, Hämochromatose) eine große Rolle. Die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) als eine schwere Form der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD) zählt mittlerweile zu einer der am häufigsten auftretenden Lebererkrankungen. Früher ging man davon aus, es sei eine Erkrankung der sogenannten „Westlichen Welt“, aber die Prävalenz ist in vielen geographischen Regionen wie z.B. USA, Südamerika, Europa, Asien, Australien und dem Mittleren Osten sehr hoch [1]. Mittlerweile ist NASH in den USA die dritthäufigste Indikation als Ursache für eine Lebertransplantation beim Hepatozellulären Karzinom (HCC) mit steigender Tendenz in der Zukunft [2]. Oftmals wird die Ausbildung der NASH als Manifestation des metabolischen Syndroms in der Leber bezeichnet, wobei diese Erkrankung nicht so intensiv wie beispielsweise Diabetes mellitus oder koronare Herzerkrankung diskutiert wird [3]. Risikofaktoren und Begleiterscheinung sind vor allem viszerales Übergewicht und Insulinresistenz, Glukoseintoleranz, Dyslipidämie sowie veränderte Adipokinprofile [4]. Die chronische Schädigung der Leber bei einer NASH wird wesentlich durch die Hauptmerkmale Steatose, lobuläre Inflammation, fibrotischer Umbau des Lebergewebes und hepatozelluläres „*ballooning*“ (Aufblähen der Hepatozyten) charakterisiert [5].

2.2 Pathomechanismus der NASH mit besonderer Betrachtung von Organwechselwirkungen

2.2.1 Theorien zur Pathogenese der NASH

Die Pathogenese der NASH ist im Detail noch immer nicht genau verstanden [6]. Bekannt ist jedoch, dass der Pathomechanismus der NASH eine große Vielzahl von Signalwegen umfasst und somit äußerst komplex ist.

Nach der ersten Beschreibung der NASH durch Ludwig *et al.* 1980 [7] hat Christopher Day in den 1990er Jahren die bekannte „*two hit*“ Hypothese aufgestellt. Hier wird, wie in Abbildung 1 zu sehen, postuliert, dass die Steatose den „*first hit*“ darstellt und die

Leber für die folgenden „*second hits*“, oxidativer Stress, Endotoxine, Adduktbildung und Bedingungen, die eine erhöhte ATP-Bereitstellung erfordern, sensibilisiert [8]. Folglich kommt es durch den erhöhten Fettgehalt in der Leber zur Lipidperoxidation sowie zu einer verminderten Bereitstellung von ATP und durch eine Stimulation des Immunsystems bzw. Sensibilisierung gegenüber Endotoxinen zu Hepatitis und Fibrose (Abb. 1, rechts). Unter normalen Bedingungen kommt es zu keiner Erhöhung der Peroxidation und die Leber ist unempfindlich gegen Endotoxine (Abb. 1, links).

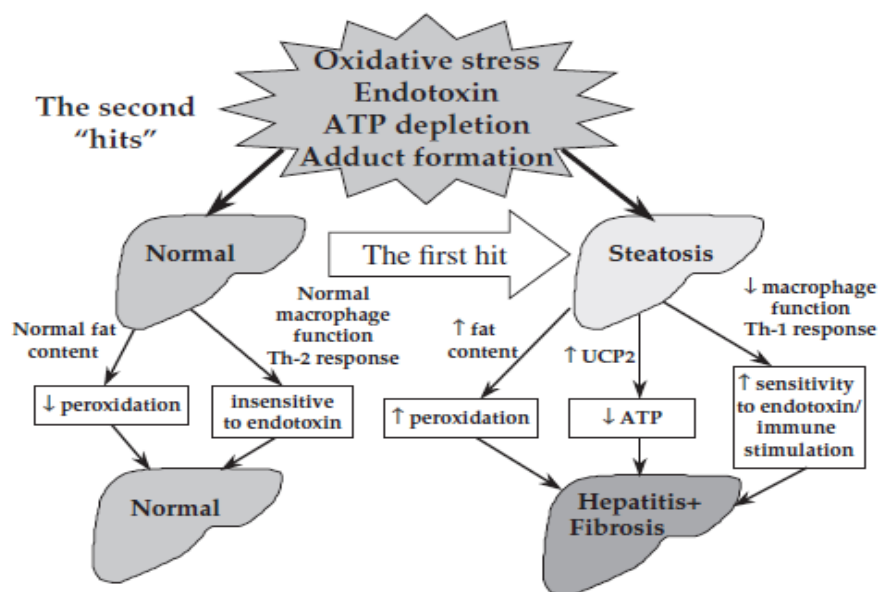
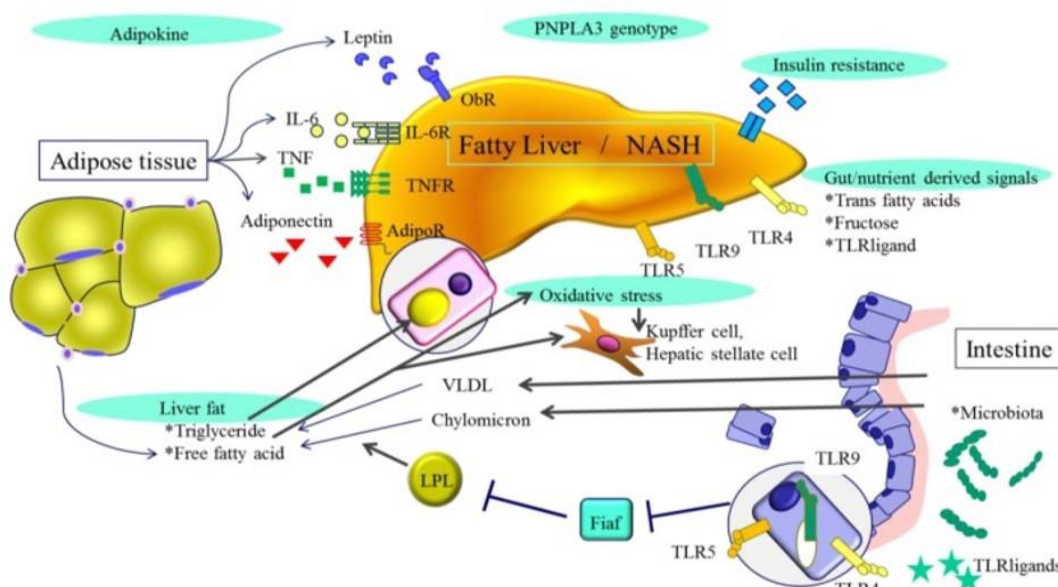


Abbildung 1: Schematische Darstellung der „two hit“ Hypothese aus Day *et al.* zur Molekularpathogenese der NASH. Aus [8].

Die Ausbildung der Steatose bezeichnet den ersten *hit*, gefolgt von vermutlich mehreren zweiten *hits* (oxidativer Stress, verminderte ATP-Bereitstellung, Endotoxine). Nach Day *et al.* 2002. (ATP: Adenosintriphosphat, Th-1/Th2: T-Helferzelle 1/2, UCP2: *uncoupling protein 2*)

Mittlerweile gehen Wissenschaftler aber mehr und mehr von einer „*multiple hit*“ Hypothese aus [4,9], d.h. viele verschiedene Einflussfaktoren scheinen eine Rolle zu spielen, wie in Abbildung 2 dargestellt. Auch genetische Prädispositionen wie z.B. der *Patanin-like phospholipase 3* (PNPLA 3) Polymorphismus werden mit in die *multiple hit* Theorie einbezogen [4]. Takaki *et al.* gehen davon aus, dass es mehrere parallele *hits* gibt. Dazu gehören die erwähnten genetischen Unterschiede, Insulinresistenz und die intestinale Mikroflora, die alle zum Voranschreiten der Steatohepatitis beitragen. Eine wichtige Rolle spielen laut den Autoren auch die induzierte Adipokinsekretion aus dem Fettgewebe sowie oxidativer Stress.

Multiple parallel hit theory



Copyright © 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland

Abbildung 2: Schematische Darstellung der „multiple hit“ Theorie zur Pathogenese der NASH. Aus [4].

Die Ausbildung der NASH wird maßgeblich durch verschiedene parallel wirkende Einflussfaktoren begünstigt. Dazu gehören oxidativer Stress, Signale aus dem *Intestinum*, Insulinresistenz, der Genotyp, Adipokine und das Fett in der Leber (blau hinterlegt). Dadurch werden in der Leber diverse Signalkaskaden aktiviert, die zur Progression der Steatose und zur Steatohepatitis beitragen. Nach Takaki *et al.* 2013. (ObR: Leptinrezeptor, IL-6: Interleukin-6, IL-6R: Interleukin-6 Rezeptor, TNF: Tumor Nekrose Faktor alpha, TNFR: Tumor Nekrose Faktor alpha Rezeptor, Adipo-R: Adiponectin Rezeptor, LPL: Lipoprotein Lipase, VLDL: *very low density* Lipoprotein, Fiaf: *Fasting induced adipose factor*, TLR: *Toll-like* Rezeptor)

Die Entstehung der NASH wird dabei durch das Zusammenspiel von Darm-, Fettgewebe- und Immunsystem-assoziierten Signalmoleküle (u.a. pro-inflammatorische Zytokine, Adipokine), welche mit ihren spezifischen Rezeptoren in der Leber interagieren, begünstigt (Abb.2). Eine wichtige Rolle dabei spielen auch die sogenannten *Toll-like* Rezeptoren (TLR), dessen Funktionen in Kapitel 2.2.3 näher beschrieben werden.

Hin und wieder wird die Erkrankung NASH nur auf die Symptomatik in der Leber reduziert. Sehr wahrscheinlich entsteht die NASH jedoch auch durch direkte und indirekte Wechselwirkungen zwischen der Leber und anderen Organen wie dem Fettgewebe, dem Immunsystem und dem Darm, welche im Folgenden näher betrachtet werden.

2.2.2 Wechselwirkung zwischen Leber und Fettgewebe

Das Fettgewebe wurde in der Vergangenheit lediglich als „Fett-Speicher“ ohne weitere Funktion betrachtet. Mittlerweile ist bekannt, dass das Fettgewebe durchaus ein Organ mit hoher metabolischer Aktivität ist, endokrine Funktionen besitzt und auch immunologisch eine Rolle spielt [10]. Seit den 1980er Jahren wird intensiv auf diesem

Gebiet gearbeitet und es wurde gefunden, dass das Fettgewebe eine bedeutende Quelle für sekretorische Proteine darstellt [11]. Dazu gehören unter anderem der Komplementfaktor D, Leptin, Adiponektin, und Resistin. Auch pro-inflammatorische Zytokine, Akut-Phase-Proteine wie Serumamyloid A und Lipocalin 24p3 sowie Enzyme wie die Lipoproteinlipase haben ihren Ursprung im Fettgewebe [11]. Das weiße Fettgewebe stellt weiterhin die größte Quelle freier Fettsäuren im Blut dar. Verglichen mit dem subkutanen Fettgewebe zeigt besonders das viszerale weiße Fettgewebe eine hohe Mobilisierung freier Fettsäuren [12], die multiple Ursachen haben kann. Unter anderem können sowohl ein starker Gewichtsverlust als auch Übergewicht und Insulinresistenz dafür verantwortlich sein [13].

Mittels der Adipokine (Fettgewebshormone) kommuniziert das Fettgewebe mit einer Reihe von Organen wie dem Gefäßsystem, dem Gehirn, der Muskulatur, dem Reproduktionssystem, dem Pankreas und der Leber [11]. Mit dem portalen Blutstrom erreichen Adipokine bzw. sekretorische Proteine, pro-inflammatorische Zytokine und durch Lipolyse freigesetzte Fettsäuren die Leber. Freie Fettsäuren aus dem Fettgewebe und die hepatische *de novo* Lipogenese tragen neben der Ernährung maßgeblich zur Entstehung einer Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung bei [13,14]. Neben der hormonsensitiven Lipase (HSL) scheint die Adipozyten-Triglyzeridlipase (ATGL) limitierend für Freisetzung der Fettsäure zu sein, was aus tierexperimentellen Studien bekannt ist [13].

Im Gefäßsystem werden Fettsäuren an Albumin gebunden transportiert, nur ein kleiner Teil liegt frei vor [15]. Freie Fettsäuren können von Hepatozyten durch Diffusion über die Membran aufgenommen werden. Außerdem erfolgt die Aufnahme vermutlich Carrier-vermittelt über das Fettsäurebindungsprotein (FABP), die Fettsäuretranslokase (FAT bzw. CD36) und das Fettsäuretransportpolypeptid (FATP) [15]. Interessanterweise ist das FABP genetisch identisch zur mitochondrialen Aspartataminotransferase (AST), was darauf hindeutet, dass eine vermehrte Expression zu einer gesteigerten Aufnahme von freien Fettsäuren und zum Export des Enzyms aus dem Hepatozyt führen kann [15]. Unter physiologischen Bedingungen werden die Fettsäuren in der β -Oxidation (Mitochondrium, Peroxisomen) bzw. der Cytochrom P450 4A-katalysierten ω -Oxidation (Endoplasmatisches Retikulum) energiebringend verstoffwechselt oder bei Nahrungskarenz als Ketonkörper von extrahepatischen Organen als Energiesubstrat verbraucht [16]. Die Oxidation der freien Fettsäuren ist dabei direkt proportional zur Plasmakonzentration der durch das Fettgewebe ausgeschütteten freien Fettsäuren. Die Expression der Schlüsselenzyme in der Fettsäureoxidation werden durch den Transkriptionsfaktor PPAR α reguliert. PPAR α fungiert als Lipidsensor in der Leber und

reagiert auf den Anstieg von Fettsäuren mit der Stimulation der Transkription von durch PPAR α regulierten Genen [16]. Fehlendes oder nicht-funktionelles PPAR α führt zwangsläufig zur verminderten Fettsäureoxidation und einer gesteigerten hepatischen Triglyzeridsynthese. Diese resultiert in einer Steatose [14,16], welche hervorgerufen durch einhergehenden oxidativen Stress und ER (Endoplasmatisches Retikulum)-Stress zur Steatohepatitis fortschreiten kann.

Das Fettgewebe als endokrines Organ hat unter physiologischen Bedingungen einen maßgeblichen Einfluss auf den Leberstoffwechsel. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass pathophysiologische Veränderungen im Stoffwechsel des Fettgewebes sich auch auf den Leberstoffwechsel auswirken und mutmaßlich die Entstehung einer NASH begünstigen.

2.2.3 Wechselwirkung zwischen Leber und Immunsystem

Aus der aktuellen Literatur ist bekannt, dass sowohl das innate als auch das adaptive Immunsystem einen Einfluss auf die Entstehung der NASH haben [10]. Eine wesentliche Rolle spielen dabei die sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs) und die Schädigung-assoziierten molekularen Strukturen (DAMPs), die über Strukturerkennungsrezeptoren (PRR) wahrgenommen werden und zur Entzündung beitragen [10,17]. Zu den PRRs gehören *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomänen (NOD)-ähnliche Rezeptoren (NLRs) und Retinsäure-induzierbares Gen I (RIG-I)-ähnliche Rezeptoren (RLRs) [17]. PAMPs werden von exogenen Pathogenen gebildet [18] und induzieren die Aktivierung von Genen für eine effektive Pathogenabwehr durch den Wirt [19]. DAMPs kommen bei endogenen sterilen Entzündungsgeschehen vor [20]. Ihre Rolle und Wirkung bei der Immunantwort ist in Abbildung 3 dargestellt. Im Vordergrund stehen vor allem die PRRs. Die wichtigste mit der NASH assoziierte Rezeptorgruppe sind die TLRs, im Besonderen *Toll-like* Rezeptor 4 (vgl. Abb. 2) [10,17,21]. Sie gelten als Masterregulatoren der Immunantwort und können in der Leber von verschiedenen Zellen, unter anderem von Kupferzellen, Hepatozyten und hepatischen Sternzellen exprimiert werden [22]. TLRs sind Typ I Transmembranproteine, bestehend aus einer Leucin-reichen Ektodomäne für die PAMP-Erkennung, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Toll-Interleukin 1 (IL-1)-Rezeptor (TIR)-Domäne für die nachgeschaltete Signaltransduktion [18]. *Myeloid differentiation Factor 88* (MyD88) stellt ein Adaptermolekül für die TLRs (außer TLR3) dar, wobei die Signaltransduktion entweder MyD88-abhängig oder -unabhängig stattfinden kann [22]. Bei der MyD88-abhängigen Signaltransduktion kommt es über die Aktivierung von NF κ B (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer*

of activated B-cells) zur Stimulation der Expression der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , Pro-Interleukin-1 β , Interleukin-6, Interleukin-8 und Interleukin-12 sowie Interferon γ oder *Monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1) [10,22]. Die MyD88-unabhängige Signalkette führt zur Bildung von Typ-I Interferonen [17].

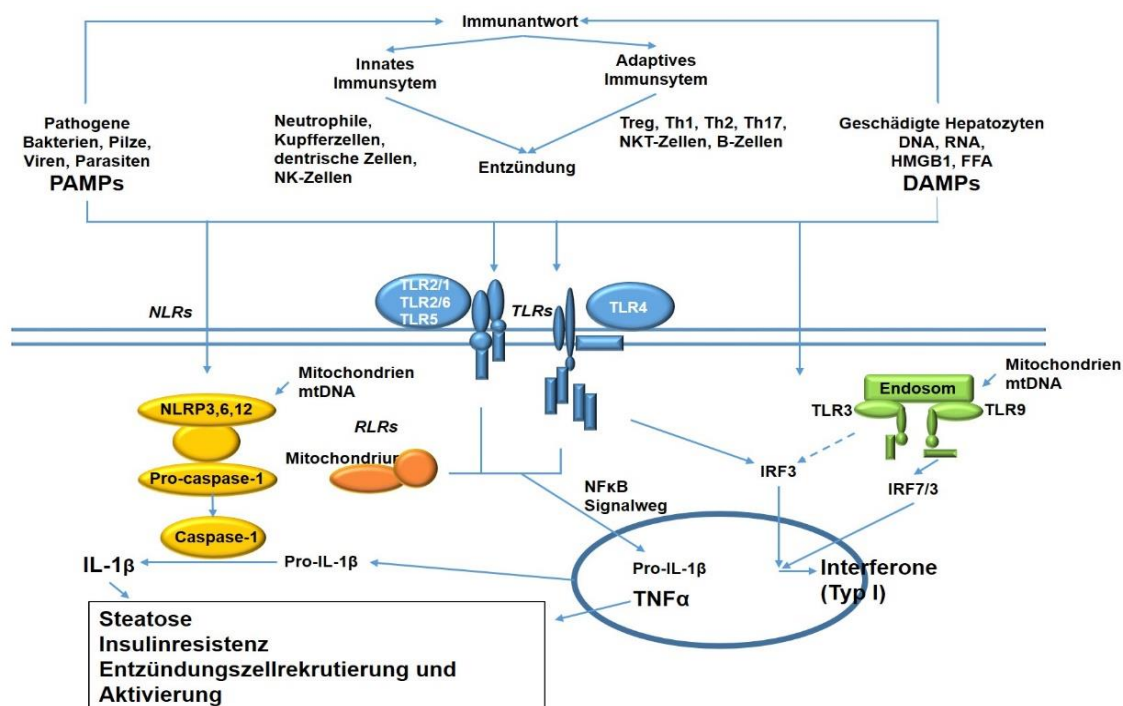


Abbildung 3: Mechanismus der durch Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) und Schädigung-assoziierte molekulare Strukturen (DAMPs) ausgelösten Immunantwort bei der Entstehung der NASH. Modifiziert nach [10].

PAMPs und DAMPs haben direkten Einfluss auf die Antwort des innaten und adaptiven Immunsystems, welche durch spezifische Zelltypen die Entzündungsreaktion auslösen können. PAMPs/DAMPs interagieren dabei direkt mit den Strukturerkennungsrezeptoren (NLR, TLR, RLR), deren nachgeschaltete Signalketten in der Abbildung vereinfacht dargestellt sind. Im Zellkern wird die Transkription von Genen der pro-inflammatorischen Zytokine bzw. deren Vorstufen sowie von Interferon Typ I-Genen stimuliert. Besonders die pro-inflammatorischen Zytokine bedingen Steatose, Insulinresistenz und Immunzellrekrutierung bzw. -aktivierung. (NK-Zellen: Natürliche Killerzellen, Treg: regulatorische T-Zellen, Th1/2/17: T-Helfer Zellen, NKT-Zellen: Natürliche Killer-T-Zellen, DNA: Desribonukleinsäure, RNA: Ribonukleinsäure, HMGB1: *High Mobility Group Box 1*, FFA: freie Fettsäuren, NLRs: Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungsdomäne (NOD)-ähnliche Rezeptoren, NLRP: Nukleotidbindungs- und Oligomerisierungs-domäne (NOD)-ähnliche Rezeptor-Protein, TLRs: *Toll-like* Rezeptoren, RLRs: Retinsäure induzierbares Gen I (RIG-I)-ähnliche Rezeptoren, NFκB: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*, IRF3/7: *Interferon regulatory transcription factor 3/7*, mtDNA: mitochondriale Desoxyribonukleinsäure, Pro-IL-1 β : Pro-Interleukin-1 β , TNF α : Tumor Nekrose Faktor α)

Eine besondere Rolle als Schlüsselrezeptor bei der NAFLD/NASH-Entstehung spielt, wie oben erwähnt, der *Toll-like* Rezeptor 4. Unter anderem konnte die Gruppe um Miele *et al.*[23] zeigen, dass Patienten mit NASH erhöhte Lipopolysaccharid (LPS)-Spiegel

aufwiesen, was auf eine erhöhte Aktivierung des TLR4 zurückgeführt werden kann. Eines der wichtigsten pro-inflammatorischen Zytokine mit umfassender Mediatorwirkung für diverse Zelltypen, die TLR4-vermittelt ausgeschüttet werden können, ist TNF α . In der Leber wird es hauptsächlich von Kupfferzellen sezerniert, trägt vermutlich zur Progression der NAFLD zur NASH bei und korreliert mit dem Fibrosegrad der Patienten [21]. Außerdem konnte eine signifikante Erhöhung der TNF α -mRNA sowie der Rezeptoren TNF-Rezeptor p55 und p75 im Leber- und Fettgewebe bei NASH nachgewiesen werden [21]. In der Leber bindet das von den Kupfferzellen sezernierte TNF α an Rezeptoren auf den hepatischen Sternzellen (HSC) und trägt über die NF κ B-Signalkaskade zur Erhöhung der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl12 bei [21]. Bcl12 ist dabei Garant für das Überleben der aktivierten hepatischen Sternzelle. Kupfferzellen können weitere Faktoren, darunter TGF β (*Transforming growth factor β*) sezernieren, das die HSC zur Matrixablagerung anregt [21]. Ein großer Bestandteil der abgelagerten Matrix besteht aus dem Fibrillen-formenden Kollagen Typ 1 α , welches sich für die NASH charakteristisch, maschendrahtzaunartig ausbreitet [5,24,25]. Unter physiologischen Bedingungen sind die ruhenden HSC eigentlich für den Transport und die Speicherung von Vitamin A verantwortlich und tragen außerdem zur dreidimensionalen Struktur der Leber bei [26]. Daneben spielt aber auch die sterile Entzündung bei der NASH-Entstehung eine wichtige Rolle. Ähnlich wie bei einer Paracetamol-Intoxikation kann die Schädigung der Hepatozyten nach einer Initiationsphase zur Schädigungsphase führen [27]. Hepatozyten werden nekrotisch und geben DAMPs ab, die wiederum Kupfferzellen aktivieren. Das Ergebnis ist eine Kaskade von molekularen Ereignissen, die der durch PAMPs verursachten vergleichbar ist.

Damit wird deutlich, dass auch das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der NASH spielt und bei näheren Betrachtungen zum Mechanismus keinesfalls außer Acht gelassen werden sollte.

2.2.4 Wechselwirkung zwischen Leber und Darm

Aktuelle Daten deuten auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Entstehung von Lebererkrankungen und einer gestörten Barrierefunktion des Darmepithels hin [28]. Da über 70% des Blutzufusses der Leber über die *Vena portae* direkt venöses Blut aus dem *Intestinum* enthalten, stellt die Leber die erste und einzige Filterstelle zwischen Blut aus der hoch kontaminierten Darmzirkulation und der sterilen systemischen Blutzirkulation dar [29]. Bei gestörter Barrierefunktion kann es somit zu Veränderung der physiologischen Prozesse in der Leber kommen, was dauerhaft zu pathologischen Veränderung und Dysfunktionen führen kann [30]. In einer Studie konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit NAFLD eine signifikant erhöhte Darm-

permeabilität verglichen mit gesunden Probanden aufwiesen [23]. Um den zu Grunde liegenden Mechanismus genauer beleuchten und verstehen zu können, soll nun auf die physiologische Funktion sowie die pathologischen Veränderungen im *Intestinum* eingegangen werden, die mit der Pathogenese der NASH im Zusammenhang stehen könnten.

Unter physiologischen Bedingungen setzt sich die Darmflora des Menschen aus ca. 10^{14} mikrobiellen Zellen mit 15000-35000 Bakterienspezies zusammen [29,31]. Es handelt sich dabei um einen dynamischen Mix, der sich in seiner Qualität und Quantität zwischen Individuen sowie Spezies auch stark unterscheiden kann. Auch die Zusammensetzung der luminalen und der Oberflächen-adhärenenten Besiedelung ist verschieden [30]. Die Beschaffenheit der Darmbarriere, die Zusammensetzung des Mikrobioms sowie die daraus resultierenden Wechselwirkungen mit der Leber können durch die Nahrung, Toxine, Umweltfaktoren sowie genetische Prädispositionen beeinflusst werden [29]. Das intestinale Epithel ist ein einschichtiges Zylinderepithel, welches als Barriere des Körpers gegenüber der Außenwelt dient. Eine wichtige Rolle spielen dabei die sogenannten Adhäsionsverbindungen (*Adherense Junctions*) und die *Tight Junctions*, die dazu beitragen, dass benachbarte Zellen fest miteinander verbunden sind [32]. Je nach Art der Verbindungen sind diese u.a. aus Cadherinen, Claudinen, Occludinen und junktionalen Adhäsionsmolekülen [32] zusammengesetzt, die neben ihrer strukturellen Aufgabe auch in verschiedene Signalwege (wnt-, notch-, hippo-, hedgehog- und TGF β -BMP-Signalweg) involviert sind [32]. Sie tragen zur Regulation der intestinalen Homöostase bei, indem sie Proliferation, zellulärer Migration, Differenzierung, Polarisierung apikaler Apoptose und luminale Abstoßung kontrollieren [33]. Eine Störung der Barrierefunktion hat ihre Ursache vermutlich in der TNF α -abhängigen Dysregulation der *Tight Junctions*, wodurch wiederum die mukosale TNF α -Produktion begünstigt wird. Dies weist auf einen zusammenhängenden Kreislauf zwischen der Aktivierung des Immunsystems und epithelialer Barrieredysfunktion hin [34]. Hier spielt das Immunsystem, insbesondere das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) als größtes immunologisches Organ des Körpers, eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von PAMPs und DAMPs und der damit ausgelösten Immunantwort und Produktion des Mastermediators TNF α (siehe Kapitel 2.2.3). Störungen der Homöostase des Darmepithels können zum Bruch der intestinalen Barriere führen und eine bakterielle Translokation hervorrufen [30]. In die Pfortader übertretende Bakterien führen dann in der Leber zur Aktivierung der gewebständigen Makrophagen (Kupfferzellen), welche TNF α produzieren und zur Entzündung beitragende intrazelluläre Signalwege anschalten [30]. Daneben induzieren bakterielle Endotoxine wie Lipopolysaccharide durch morphologische und funktionelle Veränderungen die hepatische Entzündungs-

antwort [30], indem sie mit CD14-tragenden Zellen interagieren (z.B. Neutrophile, Makrophagen). Diese Zellen sezernieren TLR 4-vermittelt u.a. TNF α , Interleukin-1 β , Interleukin-8, Interleukin-12, zyklische Endoperoxidasen, PAF(*platelet activating factor*), Komplementfaktoren sowie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und tragen zur Verstärkung der Leberschädigung bei [30,35]. Im Vordergrund dabei stehen eine ROS-vermittelte Zerstörung umliegender Hepatozyten und ein verminderter hepatischer Blutstrom, die zu Dysfunktionen führen [35].

Auch Veränderungen der Nahrungszusammensetzung und Exposition gegenüber Umweltfaktoren tragen zur Veränderung des Mikrobioms im *Intestinum* bei. Dadurch hervorgerufene Veränderungen des intestinalen Milieus können zu epithelialen Dysfunktionen mit einer resultierenden Schädigung der Barrierefunktion führen. Auch hierbei begünstigen bakterielle Translokation und bakterielle Endotoxine die Aktivierung des Immunsystems, v.a. auch in extraintestinalen Geweben wie der Leber, wodurch es zu Gewebeschäden kommen kann, die vermutlich zur Ausbildung der Steatohepatitis beitragen.

2.3 Tiermodelle der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen (NAFLD)

2.3.1 Allgemein

Eine Reihe verschiedener Nagetiermodell zur NAFLD/NASH wurden in den letzten Jahren beschrieben. Eine große Herausforderung dabei besteht immer noch darin, ein Modell zu entwickeln, welches analog der humanen Situation die metabolische Situation und die Progression der Leberschädigung neben der eigentlichen Steatohepatitis adäquat abbildet. Im Allgemeinen zeichnen sich die bekannten Modelle entweder durch eine konsistente Leberschädigung ohne metabolische Veränderungen oder durch metabolische Veränderungen im Zusammenhang einer NAFLD ohne Progression zur Steatohepatitis aus [1]. Larter *et al.* tragen in ihrem Übersichtsartikel von 2008 die wesentlichen Ansprüche an ein NASH-Tiermodell zusammen: Steatose, Entzündung, Leberzellschädigung (*ballooning*), Progression zur perizellulären und perivenösen Fibrose sowie Übergewicht, Insulinresistenz, Hyperglykämie im Nüchternzustand, Dyslipidämie sowie ein verändertes Adipokinprofil. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick zu den diversen Modellen der NAFLD/NASH gegeben werden. Einzelheiten zu den Modellen sind im *Supplement 1* und *2* im Anhang zu finden.

Die verschiedenen Modelle der NAFLD/NASH können in genetische und nahrungsinduzierte Modelle eingeteilt werden, auch Kombinationen wurden in der Literatur ausführlich beschrieben (vgl. [5]). Die genetischen Modelle können weiterhin nach ihrer

Ausprägung (Steatohepatitis > Metabolische Parameter (a) oder Steatohepatitis < Metabolische Parameter (b)) unterschieden werden. Vertreter der Kategorie (a) sind Acyl-Coenzym A Oxidase-Null-Maus (AOX, Defekt der peroxisomalen beta-Oxidation), Methionin-Adenosyltransferase 1A-Null-Maus (MAT1A, Defekt der Phosphatidylcholin-synthese) und die pten Null Maus (*phosphatase and tensin homolog*; multifunktionale Phosphatase, Tumorsuppressor) [1,3,5,36]. Weiterhin wurde von Luedde *et al.* 2007 [37] das NEMO^{LPC-KO} Modell mit spontaner Steatohepatitis mit Progression zum Hepatozellulären Karzinom (HCC) beschrieben. Zu den Modellen mit guter systemisch metabolischer, aber unzureichender hepatischer Ausprägung der NAFLD (b) gehören die SREBP-1c transgene Maus (*Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c*, Überexpression im Fettgewebe), *ob/ob* Maus (Leptinmangel), *db/db* Maus (Leptinrezeptordefekt), *fa/fa* Ratten (Leptinrezeptordefekt), *KK-Ay/a* Maus (heterozygote Mutation im Agouti-Gen, Hyperphagie), PPAR $\alpha^{-/-}$ Maus (*Peroxisome Proliferator-Activator Receptor α* , Rezeptor und Transkriptionsfaktor lipogener Enzyme) [1,3,5,36].

Neben den genetischen gibt es diverse nahrungsinduzierte Modelle der NASH, mit denen man hofft, die humane NASH widerspiegeln zu können. Das gelingt nur zum Teil, da es wie bei den oben genannten genetischen Modellen meist zur Ausprägung systemisch metabolischer oder hepatischer Charakteristika der NASH kommt. Zu den Diät-Modellen gehören die Methionin-Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät), verschiedene Hochfett-Diäten (HF-Diät) bzw. HF-Diät kombiniert mit oxidierten LDL (*low density* Lipoprotein) oder Gold Thioglucose, die Fructose-Diät sowie die *Fastfood* Diät und die atherogene Diät mit Cholesterol und Cholat [1,3,5,36]. Lieber *et al.* beschreiben 2004 [38] ein Modell in Ratten mit der flüssigen sogenannten *High fat Lieber-DeCarli* Diät. Außerdem sind Modelle einer intragastrischen Überernährung [39], totaler parenteraler Überernährung [40] und kalorischer Überbelastung durch Sondenernährung [41] bekannt.

Ein weiterer Versuch das humane Krankheitsbild der NASH besser abzubilden, ist die Kombination einer der oben genannten Diäten mit genetisch veränderten Modellen. Man geht davon aus, dass speziell diese Modelle besonders geeignet sind für die Untersuchungen des komplexen biologischen Zusammenspiels bei der Entstehung von NAFLD [1]. Ein vermeintlich gutes Modell, welches sowohl systemisch metabolische als auch hepatische Manifestationen der NASH aufweist, ist die sogenannte *fat aussie* Maus (*foz/foz* Maus) in Kombination mit einer HF-Diät [1]. Dieses Modell erfüllt die Kriterien Übergewicht, Insulinresistenz, Dyslipidämie, Adipokinveränderungen, Steatose, Entzündung, Leberzellschädigung und Fibrose [42].

Die Vielzahl der verschiedenen Modelle zeigt deutlich, dass es sehr schwierig und bisher nahezu unmöglich ist, eine Steatohepatitis vergleichbar mit der humanen NASH zu induzieren. Trotzdem bieten die unterschiedlichen Modelle mit ihren spezifischen Einschränkungen die Möglichkeit, gezielt spezielle Aspekte der Entstehung der Steatohepatitis untersuchen zu können.

2.3.2 Pfp/Rag2^{-/-} Maus Modell

Das in den vorliegenden Publikationen spezifisch gewählte Pfp/Rag2^{-/-} Mausmodell (genetischer Hintergrund C57BL/6 Stamm) zeichnet sich durch seine Immundefizienz aus, die durch die Ausschaltung des Pfp und des Rag2-Gens gekennzeichnet ist. Perforin (Pfp), ein zytolytisches Protein, das in Granula zytotoxischer T-Zellen und NK-Zellen zu finden ist, ist verantwortlich für die Porenbildung in der Zielzelle und der daraus resultierenden Apoptose. Das Rekombinase-aktivierende Gen 2 (Rag2) befindet sich ausschließlich in Lymphozyten und ist zuständig für die Ausreifung von B- und T-Zellen im Rahmen der VDJ-Rekombination. Durch den Gendefekt kann keine Ausreifung von T- und B-Zellen erfolgen, womit das adaptive Immunsystem als depletiert betrachtet werden kann. Zusätzlich sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als Teil des innaten Immunsystems depletiert. Aufgrund dieses Versuchsaufbaus ist es möglich, die Entstehung der NASH ohne die Beteiligung des adaptiven Immunsystems zu untersuchen. Weiterhin ist dieses Modell als xenogenes Transplantationsmodell geeignet, was im Hinblick auf Untersuchungen zum therapeutischen Nutzen humaner Stammzellen von großer Bedeutung ist. Analytisch sind darüber hinaus humane Zelltransplantate einfach mittels eines immunhistochemischen Nachweises humaner Antigene wie z.B. des HepPar1 im Mausleberparenchym zu detektieren.

Für die Induktion der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis wurde in der vorliegenden Arbeit die bereits im Kapitel 2.3.1 erwähnte Methionin-Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät) gewählt. Die Leberschädigung in diesem Modell ist maßgeblich auf den Mangel von Cholin und Methionin zurückzuführen [13]. Cholin wird im Wesentlichen für die Phosphatidylcholin-Synthese benötigt, welches für den Triglyzeridexport via VLDL aus der Leber von essentieller Bedeutung ist [43]. Methionin, als essentiellen Aminosäure, dient als Methylgruppendonor in die Proteinbiosynthese und spielt eine wichtige als Intermediate bei der Synthese von Enzymen im anti-oxidativen Stoffwechsel (S-Adenosylmethionin und Gluthation) [44]. Es wird beschrieben, dass es durch die Induktion einer NASH mittels MCD-Diät in C57BL/6 Mäusen zu einer Gewichtsreduktion im Versuchsverlauf kommt [45-47]. Zusätzlich begünstigt die MCD-Diät durch die im Plasma ansteigenden Endotoxinspiegel die NASH-Progression durch die Aktivierung der TLR-4 Signalkaskade in Hepatozyten und anderen Leberzellen wie Kupffer- und

hepatischen Sternzellen [48]. Des Weiteren zeigen anderen Arbeiten [49,50], dass die Diät nicht zur Ausbildung einer Insulinresistenz bzw. gesteigerten peripheren Insulinsensitivität führt und das Adipokin Leptin nicht signifikant erhöht ist. Dagegen weisen Leclercq *et al.* [51] eine intrahepatische Insulinresistenz nach, was ein klarer Gegensatz zu der typischen klinischen Situation beim Menschen ist (s. 2.2.1). Nichtsdestotrotz bietet dieses Modell in der vorliegenden Arbeit den wesentlichen Vorteil, die Entstehung der NASH in der Leber ohne sekundäre Wechselwirkung und systemische Effekte des metabolischen Syndroms, die durch Veränderung der Insulinsensitivität und des Leptinspiegels hervorgerufen werden, zu studieren.

Zusammenfassend ist das immundefiziente Pfp/Rag2^{-/-} Mausmodell in Kombination mit der MCD-Diät besonders geeignet, den der NASH zu Grunde liegenden Pathomechanismus ohne vermeintlich sekundäre Effekte durch das adaptive Immunsystem sowie das metabolische Syndrom mit veränderten Insulin- und Leptinspiegeln zu untersuchen. Gleichzeitig spiegelt das Modell den Gewichtsverlust wie er etwa bei extremer Kalorienrestriktion oder nach bariatrischer Intervention, die zur NASH führen können, wider [13].

2.4 Therapie der NASH mittels mesenchymaler Stammzellen

2.4.1 Charakteristika mesenchymaler Stammzellen

In der regenerativen Medizin gelten Stammzellen heute als prominente und vielversprechende Kandidaten für die klinische Zelltherapie bei unterschiedlichen Indikationen [52,53]. Embryonale Stammzellen (ES), induzierte pluripotente Stammzellen (iPS) und adulte Stammzellen sind grundsätzlich für die therapeutische Anwendung geeignet. Bei näherer Betrachtung wird jedoch deutlich, dass ES und iPS einerseits aus ethischen Gründen sehr bedenklich sind und andererseits aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften ein großes Tumorpotential aufweisen [53,54]. Aus diesem Grund gewinnen adulte Stammzellen immer größeres klinisches Interesse im Bereich von Zell- und Gewebeersatztherapie. Zu den adulten Stammzellen zählt man hämatopoetische und mesenchymale (MSC) Stammzellen. Hämatopoetische Stammzellen entstammen dem Knochenmark und sind für die Neubildung von Blutzellen verantwortlich [55]. MSC können aus einer Reihe verschiedener Gewebe isoliert werden. Dazu gehören Knochenmark, Fettgewebe, Haut, Niere, Muskel, Zahnpulpa, Milz und Herz [56]. Die Zellen weisen multiples Differenzierungspotential auf und verfügen über die Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen, u.a. Knochenzellen oder Chondroblasten zu differenzieren [57]. Dazu zeigt die Arbeitsgruppe Christ, dass sich humane mesenchymale Stammzellen sowohl aus Knochenmark als auch aus dem Fettgewebe in Hepatozyten-ähnliche Zel-

len differenzieren lassen [58,59]. Dabei weisen sie typische hepatozytäre Eigenschaften wie Harnstoffsynthese und Gluconeogenese bzw. Glykolyse und Fremdstoffmetabolismus [58,59] auf. In Bezug auf die Funktionalität der Zellen ist interessant, dass nach der hepatozytären Differenzierung Zellen mit Eigenschaften periportal (Harnstoffsynthese, Gluconeogenese) wie auch perivenöser Hepatozyten (Glykolyse, Fremdstoffwechsel) entstehen. Dies entspricht der Situation in der Leber, in der Hepatozyten um die Verzweigungen der Portalvene (periportal) andere metabolische Qualitäten aufweisen als Hepatozyten um die Verzweigungen der Lebervene (perivenös) [60].

2.4.2 Therapeutischer Einsatz von mesenchymaler Stammzellen

Der therapeutische Einsatz von mesenchymalen Stammzellen wird grundlagenwissenschaftlich und klinisch als sehr vielversprechend betrachtet. Es gibt eine Reihe verschiedener Erkrankungen, bei denen MSC therapeutisch eingesetzt werden und deren Nutzen bereits untersucht und beschrieben wurde. Dazu gehören unter anderen der akute Nierenschaden [61], chronische respiratorische Erkrankungen [62], *Graft-versus-Host* Krankheit [63], amyotrophe Lateralsklerose [64], Schlaganfall [65] und entzündliche Darmerkrankungen [66]. Zu den Gründen für die Wahl von MSC als „Therapeutikum“ zählen unter anderem ihre nachgewiesenen anti-inflammatorischen, immunmodulatorischen, anti-apoptotischen und pro-proliferativen Eigenschaften, wodurch sie insbesondere bei entzündlichen und degenerativen Erkrankungen Anwendung finden können [67,68]. Almeida *et al.* beschreiben für die Wirksamkeit bei akuter Nierenschädigung zusätzlich anti-oxidative, anti-fibrotische, pro-angiogene Eigenschaften sowie die Anregung zum zellulären „*Reprogramming*“ und die Stimulation der Proliferation von endogenen Progenitorzellen [61]. Aufgrund dieser beschriebenen Eigenschaften und der ethischen Unbedenklichkeit stellt der Einsatz mesenchymaler Stammzellen auch eine potentielle Therapiestrategie bei akuten und chronischen Leberschädigungen dar. Aus publizierten Arbeiten [58,59] ist bekannt, dass sowohl hepato-gen differenzierte MSC aus dem Knochenmark sowie dem Fettgewebe in der Lage sind, sich nach einer partiellen Resektion im Empfängerparenchym funktionell zu integrieren. Tiermodelle der akuten Leberschädigung durch Paracetamol zeigen, dass die Transplantation von MSC zu einer Verbesserung der Symptomatik führt und die transplantierten MSC eine anti-apoptotische und pro-proliferative Wirkung auf die Empfängerleber ausüben [69,70]. Bei chronischen Lebererkrankungen gibt es Hinweise, dass autologe Knochenmarksstammzellen sich vielversprechend auf die Erkrankung auswirken [71]. In einem nahrungsinduzierten Modell der chronischen Fettleberschädigung konnte gezeigt werden, dass transplantierte MSC die Entstehung einer Steatohepatitis

verminderten [72]. Bezüglich der klinischen Anwendung von MSC hat das Konsortium *Mesenchymal Stem Cells in Solid Organ Transplantation* (MiSOT) sich zum Ziel gesetzt, MSC aufgrund deren immunmodulatorischer Wirkung bei der Organtransplantation als Immunsuppressivum einzusetzen [73]. Die therapeutische Anwendung der MSC als Zusatztherapie bei der Organtransplantation wird bereits in klinischen Studien erprobt [74].

Abschließend kann zusammengefasst werden, dass der therapeutische Einsatz von adulten mesenchymalen Stammzellen von sehr großem Interesse für die Behandlung verschiedenster Erkrankungsarten ist und bisher bereits vielversprechende Resultate erzielt wurden. Um noch mehr Information zu den Wirkmechanismen der MSC zu erfahren, bedarf es weiterer experimenteller Studien. Diese dienen dazu, das gewonnene Wissen in die klinische Anwendung einfließen zu lassen und somit den möglichen Patientennutzen zu verbessern.

2.5 Ziele der publizierten Studien

Wie unter 2.2 beschrieben, spielt das Immunsystem bei der Ausbildung einer Nicht-alkoholischen Steatohepatitis eine maßgebliche Rolle. In der publizierten Studie „*A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation.*“ in *Experimental Cell Research* 2012 sollte untersucht werden, ob die Ausbildung einer NASH im immundefizienten Pfp/Rag2^{-/-} Mausmodell unter Betrachtung charakteristischer Marker der Erkrankung *per se* möglich ist. Die potentielle Induktion der NASH mittels MCD-Diät in der immundefizienten Maus stellt dabei ein Novum dar. Es blieb zu analysieren, ob die Befunde mit denen des C57BL/6 Stammes vergleichbar sind. Zusätzlich sollte ein adäquates Fütterungsregime für die Induktion der NASH beschrieben werden, das die Transplantation von humanen hepatozytär differenzierten Zellen zulässt.

In der zweiten publizierten Studie „*Human mesenchymal stem cells towards non-alcoholic steatohepatitis in an immunodeficient mouse model*“ in *Experimental Cell Research* von 2014 sollte die Wirkung von transplantierten humanen hepatozytär differenzierten Stammzellen auf die NASH analysiert werden. Es sollte geklärt werden, ob die transplantierten MSC einen therapeutischen Nutzen haben und gemessen an spezifischen Markern zur Verbesserung des Krankheitsbildes führen. Daraus sollten mögliche Mechanismen in Bezug auf die Pathogenese der NASH sowie die Wirkung der Stammzellen abgeleitet werden.

3 Publikationsmanuskripte

3.1 A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation

Sandra Pelz¹, Peggy Stock¹, Sandra Brückner¹, Bruno Christ

Department of Medicine I, Martin-Luther University of Halle-Wittenberg, Heinrich-Damerow-Straße 1, D-06120 Halle/Saale, Germany

Received 23 July 2011, Revised 12 October 2011, Accepted 5 November 2011, Available online 13 November 2011

Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is associated with fat deposition in the liver favoring inflammatory processes and development of fibrosis, cirrhosis and finally hepatocellular cancer. In Western lifestyle countries, NASH has reached a 20% prevalence in the obese population with escalating tendency in the future. Very often, liver transplantation is the only therapeutic option. Recently, transplantation of hepatocyte-like cells differentiated from mesenchymal stem cells was suggested a feasible alternative to whole organ transplantation to ameliorate donor organ shortage. Hence, in the present work an animal model of NASH was established in immunodeficient mice to investigate the feasibility of human stem cell-derived hepatocyte-like cell transplantation. NASH was induced by feeding a methionine/choline-deficient diet (MCD-diet) for up to 5 weeks. Animals developed a fatty liver featuring fibrosis and elevation of the proinflammatory markers serum amyloid A (SAA) and tumor necrosis factor alpha (TNF α). Hepatic triglycerides were significantly increased as well as alanine aminotransferase demonstrating inflammation-linked hepatocyte damage. Elevation of α SMA mRNA and collagen I as well as liver architecture deterioration indicated massive fibrosis. Both short- and long-term post-transplantation human hepatocyte-like cells resided in the mouse host liver indicating parenchymal penetration and most likely functional engraftment. Hence, the NASH model in the immunodeficient mouse is the first to allow for the assessment of the therapeutic impact of human stem cell-derived hepatocyte transplantation.

Experimental Cell Research (2012)

Online Resources:

http://ac.els-cdn.com/S0014482711004447/1-s2.0-S0014482711004447-main.pdf?_tid=b6b6d99e-95a3-11e4-9adc-00000aacb362&acdnat=1420549290_acd70931c199c19e23aac71114b6c4bc

doi:10.1016/j.yexcr.2011.11.005

3.2 Human mesenchymal stem cells towards non-alcoholic steatohepatitis in an immunodeficient mouse model

Sandra Winkler^a, Erawan Borkham-Kamphorst^b, Peggy Stock^a, Sandra Brückner^a, Matthias Dollinger^c, Ralf Weiskirchen^b, Bruno Christ^{a, d}

a Applied Molecular Hepatology Laboratory, Department of Visceral, Transplantation, Thoracic and Vascular Surgery, University Hospital Leipzig, Liebigstraße 21, D-04103 Leipzig, Germany

b Institute of Clinical Chemistry and Pathobiochemistry, RWTH University Hospital Aachen, Pauwelsstraße 30, D-52074 Aachen, Germany

c Department for Internal Medicine I, University Hospital Ulm, Albert-Einstein-Allee 23, D-89081 Ulm, Germany

d Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM), University of Leipzig, Leipzig, Germany

Received 16 December 2013, Revised 17 April 2014, Accepted 21 April 2014, Available online 28 April 2014

Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a frequent clinical picture characterised by hepatic inflammation, lipid accumulation and fibrosis. When untreated, NASH bears a high risk of developing liver cirrhosis and consecutive hepatocellular carcinoma requiring liver transplantation in its end-stage. However, donor organ scarcity has prompted the search for alternatives, of which hepatocyte or stem cell-derived hepatocyte transplantation are regarded auspicious options of treatment. Mesenchymal stem cells (MSC) are able to differentiate into hepatocyte-like cells and thus may represent an alternative cell source to primary hepatocytes. In addition these cells feature anti-inflammatory and pro-regenerative characteristics, which might favour liver recovery from NASH. The aim of this study was to investigate the potential benefit of hepatocyte-like cells derived from human bone marrow MSC in a mouse model of diet-induced NASH. Seven days post-transplant, human hepatocyte-like cells were found in the mouse liver parenchyma. Triglyceride depositions were lowered in the liver but restored to normal in the blood. Hepatic inflammation was attenuated as verified by decreased expression of the acute phase protein serum amyloid A, inflammation-associated markers (e.g. lipocalin 2), as well as the pro-inflammatory cytokine TNF α . Moreover, the proliferation of host hepatocytes that indicate the regenerative capacity in livers receiving cell transplants was enhanced. Transplantation of MSC-derived human hepatocyte-like cells corrects NASH in mice by restoring triglyceride depositions, reducing inflammation and augmenting the regenerative capacity of the liver.

Experimental Cell Research (2014)

Online Resources:

http://ac.els-cdn.com/S001448271400175X/1-s2.0-S001448271400175X-main.pdf?_tid=d8578614-95a5-11e4-b564-00000aacb361&acdnat=1420550206_f82d5425b72895d9a79ff262950a8bec

doi:10.1016/j.yexcr.2014.04.017

Supplement 1

Supplement 2

Supplement 3

Supplement 4

Supplement 5

Supplement 6

.

Supplement 7

Supplement 8

Supplement 9

4 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

Untersuchungen zur therapeutischen Anwendung mesenchymaler Stammzellen bei chronischen Lebererkrankungen am Beispiel der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis

eingereicht von: Sandra Winkler

angefertigt in: Universität Leipzig

Universitätsklinikum

Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-,

Thorax- und Gefäßchirurgie

Arbeitsgruppe Angewandte Molekulare Hepatologie

Betreut von Prof. Dr. rer. nat. Bruno Christ

Dr. rer. nat. Corinna Dietel

Mai 2014

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Untersuchungen zur therapeutischen Anwendung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) bei der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis. Die Nicht-alkoholische Steatohepatitis (NASH) ist eine immer häufiger auftretende chronische Lebererkrankung und wird als eine besonders schwere Form der Nicht-alkoholischen Fettlebererkrankungen bezeichnet. Unbehandelt kann sich die NASH weiter zu einer Leberzirrhose und sogar zu einem Hepatozellulären Karzinom (HCC) entwickeln. Charakteristisch für die NASH sind massive Fetteinlagerungen (Steatose) sowie Entzündungsprozesse in der Leber. Weiterhin tritt im Verlauf ein Funktionsverlust des Organs durch den fibrotischen Umbau des Lebergewebes auf. Begleiterscheinung sind häufig massives Übergewicht, Hyperglykämie und Insulinresistenz, typische Symptome eines metabolischen Syndroms. Aus diesem Grund wird auch bei einer NASH häufig von der Manifestation des metabolischen Syndroms in der Leber gesprochen. Auf der Suche nach innovativen Therapien bietet der Einsatz adulter mesenchymaler Stammzellen neue Möglichkeiten. Aufgrund ihrer multiplen Differenzierungsfähigkeit lassen sie sich beispielsweise in Leberzell-ähnliche Zellen

differenzieren und stellen somit einen möglichen funktionellen Ersatz für zu Grunde gehende Hepatozyten in der Empfängerleber dar.

In den vorliegenden Manuskripten wurde genau diese mögliche therapeutische Anwendung der mesenchymalen Stammzellen bei der nahrungsinduzierten NASH in einem Mausmodell untersucht. Dazu wurde immundefizienten Pfp/Rag2^{-/-} Mäusen bis zu fünf Wochen eine Methionin-Cholin-defiziente Diät (MCD-Diät) gefüttert. Untersucht wurde, wie sich die Diät auf charakteristische Marker der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis in dieser immundefizienten Maus auswirkt. Im Unterschied zum klinischen Erkrankungsbild beim Menschen kam es im Tiermodell zu einer starken Gewichtsreduktion, die auch mit einer Reduktion des Fettgewebes einherging. Dahingegen kam es durch die Diät zur Ausbildung einer massiven Fettleber, verbunden mit stark erhöhten Triglyzeridspiegeln in der Leber. Im Serum nahmen die Triglyzeridspiegel ab, da durch den Mangel an Cholin in der MCD-Diät kaum *Very Low Density* Lipoproteine mehr aus der Leber ausgeschleust werden konnten und somit in der Leber akkumulierten. Dieser Befund konnte auch dadurch untermauert werden, dass die Abundanz des mikrosomalen Triglyzeridtransferproteins vermindert war, welches als Chaperon eine entscheidende Rolle beim VLDL-Zusammenbau spielt. Weiterhin kam es zu entzündlichen Prozessen in der Leber, was anhand der erhöhten Genexpression des Akut-Phase Proteins Serum Amyloid A (SAA) und des pro-inflammatorischen Zytokins Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) nachgewiesen werden konnte. Die einhergehende Leberzellschädigung wurde mit dem Anstieg der Alaninaminotransferase im Serum belegt. In der Leber traten fibrotische Gewebeveränderungen auf, die sowohl durch die erhöhte Genexpression des Kollagen Typ I und des α SMA, einem Marker aktivierter hepatischer Sternzellen, als auch histologisch mittels der Immunfluoreszenz für *α -smooth muscle actin* (α SMA) und der Polarisationsmikroskopie für Kollagen Typ I-Fasern nachgewiesen werden konnten. Nach einer Fütterungsdauer von fünf Wochen wurden humane mesenchymale Stammzellen in die Lebern der Empfängertiere appliziert. Die MSC wurden dafür nach etablierten Protokollen aus Knochenmark isoliert, 14 Tage hepatogen differenziert und anschließend 1×10^6 Zellen über die Milz transplantiert. 24 Stunden und eine Woche nach der Transplantation wurden die Lebern entnommen und analysiert. Zu beiden Zeitpunkten konnten transplantierte humane Zellen im Mausempfängerparenchym mittels des humanspezifischen Antikörpers HepPar1 nachgewiesen werden. Für die weiteren Analysen wurde der Zeitpunkt eine Woche nach Transplantation betrachtet. Danach kam es zu einer signifikanten Verringerung der Genexpression von TNF α und den fibrotischen Markern Kollagen Typ I und α SMA. Dieser Befund konnte histologisch und mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden. Weitere Western Blot-Analysen zeigten, dass unter anderem die

Abundanz des inflammatorischen Akut-Phase Proteins Lipoclin 2 (LCN2) unter MCD-Diät erhöht, nach Zelltransplantation jedoch wieder herunterreguliert war. Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass sich die transplantierten MSC anti-inflammatorisch und anti-fibrotisch auf das Mausempfängerparenchym auswirkten. Zusätzlich kam es zu einer gesteigerten Proliferation nach Zelltransplantation, was auf einen stimulierenden regenerativen Effekt hindeutete. Die Steatose konnte durch eine signifikante Verringerung des Triglyzeridgehalts der Leber verbessert werden. Konsekutiv normalisierten sich die Triglyzeridspiegel im Serum.

Andere bisher unveröffentlichte Daten zur Wirkung von MSC bei einer weiteren chronischen Leberschädigung, dem alpha-1-Antitrypsinmangel, deuteten auf eine ähnliche anti-fibrotische Wirkungsweise hin (s. Supplement 3).

Der zu Grunde liegende Wirkungsmechanismus der MSC ist jedoch in beiden Modellen noch unklar. In Abbildung 4 wird ein möglicher Mechanismus für die NASH aufgezeigt.

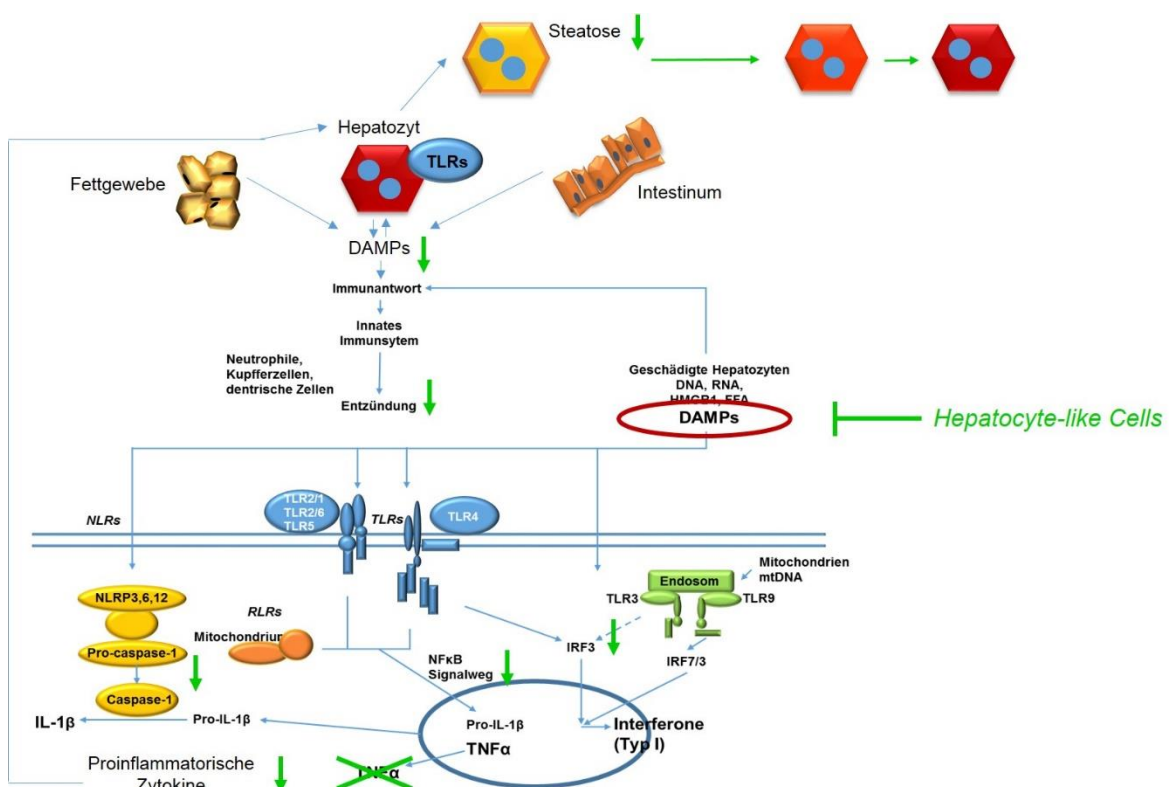


Abbildung 4: Anti-inflammatorischer Wirkmechanismus der MSC im Modell der nahrunginduzierten NASH in der immundefizienten Maus modifiziert nach [10].

Dabei hemmen die transplantierten MSC (*Hepatocyte-like cells*, grün in Abb. 4) die Entstehung der DAMPs, wodurch die TLR-vermittelte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, v.a. $\text{TNF}\alpha$, inhibiert wird. Durch diese anti-

inflammatorischen Eigenschaften wird im Folgenden die Immunantwort sowie der daraus resultierenden Entzündung und die Steatose reguliert, was zu einer Verbesserung des Erkrankungszustandes führt. Unterstützt wird diese Theorie durch vorläufigen Daten der Proteomanalyse, wobei eine verringerte Abundanz der DAMPs Heparansulfat und HSP60 (*Heat shock protein 60*) nach Transplantation im NASH Modell nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend konnte durch die MCD-Diät eine chronische Schädigung der Leber im Mausmodell induziert werden. Trotz Immundefizienz kam es zur Ausbildung einer NASH in diesem Modell, was ein Novum darstellt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass das adaptive Immunsystem nicht zwingend für die Ausbildung einer NASH nötig ist. Am entzündlichen Geschehen in der Leber scheinen hauptsächlich die Makrophagen beteiligt zu sein. Die Transplantation von humanen mesenchymalen Stammzellen im Modell der Nicht-alkoholischen Steatohepatitis wirkte sich anti-inflammatorisch, anti-fibrotisch und pro-proliferativ auf die Empfängerleber aus. Diese Umstände, verbunden mit der Abnahme der Triglyzerideinlagerung in der Leber, wirkten sich therapeutisch nutzbringend auf das Erkrankungsbild der NASH in der Maus aus. Es ist davon auszugehen, dass die Stammzellen einen parakrinen Einfluss auf das Empfängerparenchym ausüben und somit zur Verbesserung der Erkrankung beitragen. In Anbetracht der klinischen Situation könnte zukünftig auf den Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei der NASH zurückgegriffen werden. Allerdings bedarf es noch weiterer Experimente, um den genauen Wirkungsmechanismus der MSC im chronischen Leberschaden zu untersuchen und somit den klinischen Einsatz zu ermöglichen.

5 Anlagen

5.1 Literaturverzeichnis

1. Larter CZ and MM Yeh. (2008). Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right. *J Gastroenterol Hepatol* 23:1635-48.
2. Wong RJ, R Cheung and A Ahmed. (2013). Nonalcoholic steatohepatitis is the most rapidly growing indication for liver transplantation in patients with hepatocellular carcinoma in the U.S. *Hepatology*.
3. Schattenberg JM and PR Galle. (2010). Animal models of non-alcoholic steatohepatitis: of mice and man. *Dig Dis* 28:247-54.
4. Takaki A, D Kawai and K Yamamoto. (2013). Multiple hits, including oxidative stress, as pathogenesis and treatment target in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci* 14:20704-28.
5. Liu Y, C Meyer, C Xu, H Weng, C Hellerbrand, P ten Dijke and S Dooley. (2013). Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 304:G449-68.
6. Bosserhoff A and C Hellerbrand. (2011). Obesity and fatty liver are 'grease' for the machinery of hepatic fibrosis. *Dig Dis* 29:377-83.
7. Ludwig J, TR Viggiano, DB McGill and BJ Oh. (1980). Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 55:434-8.
8. Day CP and S Saksena. (2002). Non-alcoholic steatohepatitis: definitions and pathogenesis. *J Gastroenterol Hepatol* 17 Suppl 3:S377-84.
9. Anty R and M Lemoine. (2011). Liver fibrogenesis and metabolic factors. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 35 Suppl 1:S10-20.
10. Ganz M and G Szabo. (2013). Immune and inflammatory pathways in NASH. *Hepatol Int* 7:771-781.
11. Scherer PE. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55:1537-45.
12. van der Poorten D, KL Milner, J Hui, A Hodge, MI Trenell, JG Kench, R London, T Peduto, DJ Chisholm and J George. (2008). Visceral fat: a key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease. *Hepatology* 48:449-57.
13. Jha P, A Knopf, H Koefeler, M Mueller, C Lackner, G Hoefler, T Claudel and M Trauner. (2014). Role of adipose tissue in methionine-choline-deficient model of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Biochim Biophys Acta* 1842:959-970.
14. Donnelly KL, CI Smith, SJ Schwarzenberg, J Jessurun, MD Boldt and EJ Parks. (2005). Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* 115:1343-51.

15. Bradbury MW. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. I. Hepatic fatty acid uptake: possible role in steatosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G194-8.
16. Reddy JK and MS Rao. (2006). Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290:G852-8.
17. Alisi A, R Carsetti and V Nobili. (2011). Pathogen- or damage-associated molecular patterns during nonalcoholic fatty liver disease development. *Hepatology* 54:1500-2.
18. Kawai T and S Akira. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-84.
19. Netea MG, C van der Graaf, JW Van der Meer and BJ Kullberg. (2004). Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 75:749-55.
20. Rock KL, E Latz, F Ontiveros and H Kono. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol* 28:321-42.
21. Fujii H and N Kawada. (2012). Inflammation and fibrogenesis in steatohepatitis. *J Gastroenterol* 47:215-25.
22. Frasinariu OE, S Ceccarelli, A Alisi, E Moraru and V Nobili. (2013). Gut-liver axis and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease: an input for novel therapies. *Dig Liver Dis* 45:543-51.
23. Miele L, V Valenza, G La Torre, M Montalto, G Cammarota, R Ricci, R Masciana, A Forgione, ML Gabrieli, G Perotti, FM Vecchio, G Rapaccini, G Gasbarrini, CP Day and A Grieco. (2009). Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 49:1877-87.
24. Friedman SL. (2008). Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 134:1655-69.
25. Zhou X, A Jamil, A Nash, J Chan, N Trim, JP Iredale and RC Benyon. (2006). Impaired proteolysis of collagen I inhibits proliferation of hepatic stellate cells: implications for regulation of liver fibrosis. *J Biol Chem* 281:39757-65.
26. Hellerbrand C. (2013). Hepatic stellate cells--the pericytes in the liver. *Pflugers Arch* 465:775-8.
27. Jaeschke H, CD Williams, A Ramachandran and ML Bajt. (2012). Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. *Liver Int* 32:8-20.
28. Schnabl B and DA Brenner. (2014). Interactions Between the Intestinal Microbiome and Liver Diseases. *Gastroenterology*.
29. Goel A, M Gupta and R Aggarwal. (2014). Gut microbiota and liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*.

30. Compare D, P Coccoli, A Rocco, OM Nardone, S De Maria, M Carteni and G Nardone. (2012). Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 22:471-6.
31. Vanni E and E Bugianesi. (2009). The gut-liver axis in nonalcoholic fatty liver disease: Another pathway to insulin resistance? *Hepatology* 49:1790-2.
32. Jeon MK, C Klaus, E Kaemmerer and N Gassler. (2013). Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J Gastrointest Pathophysiol* 4:94-99.
33. Zbar AP, C Simopoulos and AJ Karayiannakis. (2004). Cadherins: an integral role in inflammatory bowel disease and mucosal restitution. *J Gastroenterol* 39:413-21.
34. Shen L, L Su and JR Turner. (2009). Mechanisms and functional implications of intestinal barrier defects. *Dig Dis* 27:443-9.
35. Jirillo E, D Caccavo, T Magrone, E Piccigallo, L Amati, A Lembo, C Kalis and M Gumenscheimer. (2002). The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings. *J Endotoxin Res* 8:319-27.
36. Takahashi Y, Y Soejima and T Fukusato. (2012). Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 18:2300-8.
37. Luedde T, N Beraza, V Kotsikoris, G van Loo, A Nenci, R De Vos, T Roskams, C Trautwein and M Pasparakis. (2007). Deletion of NEMO/IKKgamma in liver parenchymal cells causes steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 11:119-32.
38. Lieber CS, MA Leo, KM Mak, Y Xu, Q Cao, C Ren, A Ponomarenko and LM DeCarli. (2004). Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 79:502-9.
39. Deng QG, H She, JH Cheng, SW French, DR Koop, S Xiong and H Tsukamoto. (2005). Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology* 42:905-14.
40. Baumgardner JN, K Shankar, S Korourian, TM Badger and MJ Ronis. (2007). Undernutrition enhances alcohol-induced hepatocyte proliferation in the liver of rats fed via total enteral nutrition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293:G355-64.
41. Zou Y, J Li, C Lu, J Wang, J Ge, Y Huang, L Zhang and Y Wang. (2006). High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 79:1100-7.
42. Arsov T, DG Silva, MK O'Bryan, A Sainsbury, NJ Lee, C Kennedy, SS Manji, K Nelms, C Liu, CG Vinuesa, DM de Kretser, CC Goodnow and N Petrovsky. (2006). Fat aussie--a new Alstrom syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 20:1610-22.
43. Vance JE and DE Vance. (1985). The role of phosphatidylcholine biosynthesis in the secretion of lipoproteins from hepatocytes. *Can J Biochem Cell Biol* 63:870-81.
44. Lieber CS. (2002). S-adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am J Clin Nutr* 76:1183S-7S.

45. Gyamfi MA, I Damjanov, S French and YJ Wan. (2008). The pathogenesis of ethanol versus methionine and choline deficient diet-induced liver injury. *Biochem Pharmacol* 75:981-95.
46. Caballero F, A Fernandez, N Matias, L Martinez, R Fucho, M Elena, J Caballeria, A Morales, JC Fernandez-Checa and C Garcia-Ruiz. (2010). Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem* 285:18528-36.
47. Itagaki H, K Shimizu, S Morikawa, K Ogawa and T Ezaki. (2013). Morphological and functional characterization of non-alcoholic fatty liver disease induced by a methionine-choline-deficient diet in C57BL/6 mice. *Int J Clin Exp Pathol* 6:2683-96.
48. Rivera CA, P Adegboyega, N van Rooijen, A Tagalicud, M Allman and M Wallace. (2007). Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 47:571-9.
49. Rinella ME and RM Green. (2004). The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 40:47-51.
50. Larter CZ, MM Yeh, J Williams, KS Bell-Anderson and GC Farrell. (2008). MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol* 49:407-16.
51. Leclercq IA, VA Lebrun, P Starkel and YJ Horsmans. (2007). Intrahepatic insulin resistance in a murine model of steatohepatitis: effect of PPARgamma agonist pioglitazone. *Lab Invest* 87:56-65.
52. Lotfinegad P, K Shamsasenjan, A Movassaghpour, J Majidi and B Baradaran. (2014). Immunomodulatory nature and site specific affinity of mesenchymal stem cells: a hope in cell therapy. *Adv Pharm Bull* 4:5-13.
53. Romano G, F Morales, IR Marino and A Giordano. (2014). A commentary on iPS cells: potential applications in autologous transplantation, study of illnesses and drug screening. *J Cell Physiol* 229:148-52.
54. Okita K, T Ichisaka and S Yamanaka. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448:313-7.
55. Reya T, SJ Morrison, MF Clarke and IL Weissman. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414:105-11.
56. Hoogduijn MJ, MG Betjes and CC Baan. (2014). Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: different sources and unique characteristics? *Curr Opin Organ Transplant* 19:41-6.
57. Ong WK and S Sugii. (2013). Adipose-derived stem cells: fatty potentials for therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 45:1083-6.
58. Aurich I, LP Mueller, H Aurich, J Luetzkendorf, K Tisljar, MM Dollinger, W Schormann, J Walldorf, JG Hengstler, WE Fleig and B Christ. (2007). Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut* 56:405-15.

59. Aurich H, M Sgodda, P Kaltwasser, M Vetter, A Weise, T Liehr, M Brulport, JG Hengstler, MM Dollinger, WE Fleig and B Christ. (2009). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut* 58:570-81.
60. Jungermann K. (1995). Zonation of metabolism and gene expression in liver. *Histochem Cell Biol* 103:81-91.
61. de Almeida DC, C Donizetti-Oliveira, P Barbosa-Costa, CS Origassa and NO Camara. (2013). In Search of Mechanisms Associated with Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies for Acute Kidney Injury. *Clin Biochem Rev* 34:131-144.
62. Conese M, D Piro, A Carbone, S Castellani and S Di Gioia. (2014). Hematopoietic and mesenchymal stem cells for the treatment of chronic respiratory diseases: role of plasticity and heterogeneity. *ScientificWorldJournal* 2014:859817.
63. Herrmann RP and MJ Sturm. (2014). Adult human mesenchymal stromal cells and the treatment of graft versus host disease. *Stem Cells Cloning* 7:45-52.
64. Thomsen GM, G Gowing, S Svendsen and CN Svendsen. (2014). The past, present and future of stem cell clinical trials for ALS. *Exp Neurol*.
65. Gutierrez-Fernandez M, B Rodriguez-Frutos, L Otero-Ortega, J Ramos-Cejudo, B Fuentes and E Diez-Tejedor. (2013). Adipose tissue-derived stem cells in stroke treatment: from bench to bedside. *Discov Med* 16:37-43.
66. Singhal S, D Dian, A Keshavarzian, L Fogg, JZ Fields and A Farhadi. (2011). The role of oral hygiene in inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 56:170-5.
67. Christ B and P Stock. (2012). Mesenchymal stem cell-derived hepatocytes for functional liver replacement. *Front Immunol* 3:168.
68. Christ B and MM Dollinger. (2011). The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into the liver. *Curr Opin Organ Transplant* 16:69-75.
69. Christ B and S Bruckner. (2012). Rodent animal models for surrogate analysis of cell therapy in acute liver failure. *Front Physiol* 3:78.
70. Stock P, S Bruckner, S Winkler, MM Dollinger and B Christ. (2014). Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury. *Int J Mol Sci* 15:7004-28.
71. Takami T, S Terai and I Sakaida. (2012). Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med* 14:7-12.
72. Ezquer M, F Ezquer, M Ricca, C Allers and P Conget. (2011). Intravenous administration of multipotent stromal cells prevents the onset of non-alcoholic steatohepatitis in obese mice with metabolic syndrome. *J Hepatol* 55:1112-20.
73. <http://misot.eu/>. (2014).
74. Obermajer N, FC Popp, CL Johnson, V Benseler and MH Dahlke. (2014). Rationale and prospects of mesenchymal stem cell therapy for liver transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 19:60-4.

75. Saha AK, TG Kurowski, JR Colca and NB Ruderman. (1994). Lipid abnormalities in tissues of the KKAY mouse: effects of pioglitazone on malonyl-CoA and diacylglycerol. *Am J Physiol* 267:E95-101.
76. Yamada Y, A Muraki, M Oie, N Kanegawa, A Oda, Y Sawashi, K Kaneko, M Yoshikawa, T Goto, N Takahashi, T Kawada and K Ohinata. (2012). Soymorphin-5, a soy-derived mu-opioid peptide, decreases glucose and triglyceride levels through activating adiponectin and PPARalpha systems in diabetic KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E433-40.
77. Horie Y, A Suzuki, E Kataoka, T Sasaki, K Hamada, J Sasaki, K Mizuno, G Hasegawa, H Kishimoto, M Iizuka, M Naito, K Enomoto, S Watanabe, TW Mak and T Nakano. (2004). Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas. *J Clin Invest* 113:1774-83.
78. Hashimoto T, WS Cook, C Qi, AV Yeldandi, JK Reddy and MS Rao. (2000). Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J Biol Chem* 275:28918-28.
79. Cano A, X Buque, M Martinez-Una, I Aurrekoetxea, A Menor, JL Garcia-Rodriguez, SC Lu, ML Martinez-Chantar, JM Mato, B Ochoa and P Aspichueta. (2011). Methionine adenosyltransferase 1A gene deletion disrupts hepatic very low-density lipoprotein assembly in mice. *Hepatology* 54:1975-86.
80. Oana F, H Takeda, K Hayakawa, A Matsuzawa, S Akahane, M Isaji and M Akahane. (2005). Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism* 54:995-1001.
81. Paradis V, G Perlemuter, F Bonvoust, D Dargere, B Parfait, M Vidaud, M Conti, S Huet, N Ba, C Buffet and P Bedossa. (2001). High glucose and hyperinsulinemia stimulate connective tissue growth factor expression: a potential mechanism involved in progression to fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 34:738-44.
82. Simonelli C and RP Eaton. (1978). Reduced triglyceride secretion: a metabolic consequence of chronic exercise. *Am J Physiol* 234:E221-7.
83. Stern J, PR Johnson, MR Greenwood, LM Zucker and J Hirsch. (1972). Insulin resistance and pancreatic insulin release in the genetically obese Zucker rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 139:66-9.
84. Yimin, H Furumaki, S Matsuoka, T Sakurai, M Kohanawa, S Zhao, Y Kuge, N Tamaki and H Chiba. (2012). A novel murine model for non-alcoholic steatohepatitis developed by combination of a high-fat diet and oxidized low-density lipoprotein. *Lab Invest* 92:265-81.
85. Kohli R, M Kirby, SA Xanthakos, S Softic, AE Feldstein, V Saxena, PH Tang, L Miles, MV Miles, WF Balistreri, SC Woods and RJ Seeley. (2010). High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 52:934-44.
86. Spruss A, G Kanuri, S Wagnerberger, S Haub, SC Bischoff and I Bergheim. (2009). Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* 50:1094-104.

87. Charlton M, A Krishnan, K Viker, S Sanderson, S Cazanave, A McConico, H Masuoko and G Gores. (2011). Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G825-34.
88. Thomas A, MS Klein, AP Stevens, Y Reinders, C Hellerbrand, K Dettmer, W Gronwald, PJ Oefner and J Reinders. (2013). Changes in the hepatic mitochondrial and membrane proteome in mice fed a non-alcoholic steatohepatitis inducing diet. *J Proteomics* 80C:107-122.
89. Dorn C, JC Engelmann, M Saugspier, A Koch, A Hartmann, M Muller, R Spang, A Bosserhoff and C Hellerbrand. (2014). Increased expression of c-Jun in nonalcoholic fatty liver disease. *Lab Invest* 94:394-408.

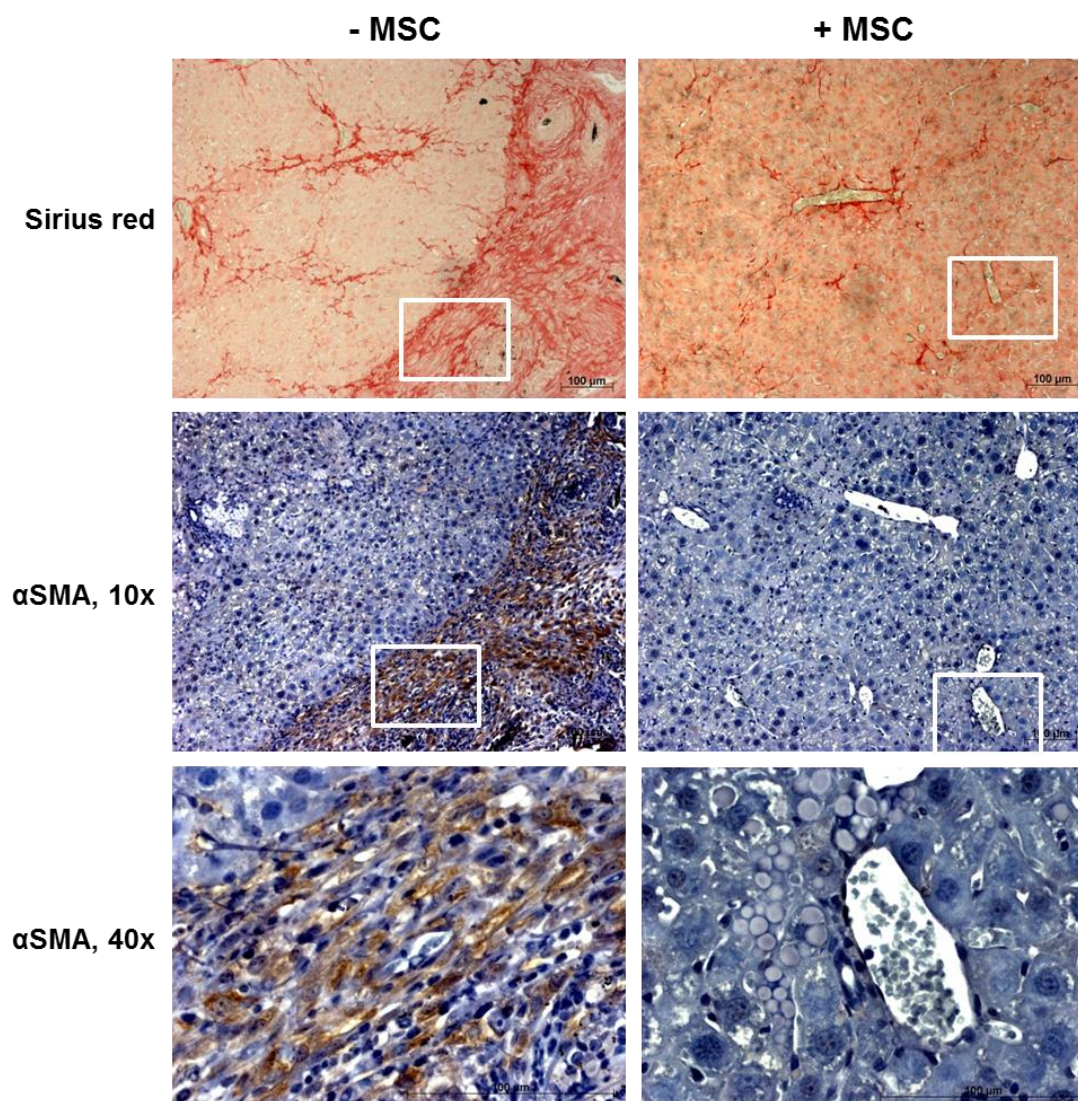
5.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der „two hit“ Hypothese aus Day et al. zur Molekularpathogenese der NASH. Aus [8].
Seite 3
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der „multiple hit“ Theorie zur Pathogenese der NASH. Aus [4].
Seite 4
- Abbildung 3: Mechanismus der durch Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs) und Schädigung-assoziierte molekulare Strukturen (DAMPs) ausgelösten Immunantwort bei der Entstehung der NASH. Modifiziert nach [10].
Seite 7
- Abbildung 4: Anti-inflammatorischer Wirkmechanismus der MSC im Modell der nahrungsinduzierten NASH in der immundefizienten Maus modifiziert nach [10].
Seite 49

Supplement 2: Zusammenfassung der nahrungsinduzierten Modelle der NASH

MODEL	Steatose	Inflammation	Leber-zellschaden	Fibrose	Übergewicht	Insulin-resistenz	Adipokine	Dyslipidämie	Referenzen
Nahrungs-induziert									
MCD-Diät	+ makro-vesikulär	+ Lymphozyten, Neutrophile	+ ballooning	+ perizellulär perivenulär	- Gewicht Adipositas	- Insulin und Glucose	+/- Adiponectin - Leptin	- TG - Cholesteroll	[1, 3, 36]
High fat Diät	+	+	-	+ mild perizellulär perivenulär	+	+ Insulin - Glucose-toleranz	-	+ Cholesteroll	[1, 3, 36]
High fat Diät kombiniert mit oxidierten LDL	+	+	+ ballooning	++	+	+	+ TNF α	+	[84]
Fructose Diät	+	+ (kombiniert mit high fat)	+ (kombiniert mit high fat)	+ (kombiniert mit high fat)	+	+	+ TNF α	+ Cholesteroll (kombiniert mit high fat)	[85, 86]
Fast Food Diät	+	+	+ ballooning	+	+	+ Insulin und Glucose	- Adiponectin + TNF α	+ Cholesteroll	[87]
Atherogene Diät	+	+	+ ballooning	+ perizellulär perivenulär	- Gewicht nach 24 Wochen	+	+ hepatische TNF α mRNA	- TG + Cholesteroll	[1, 3, 36]
Flüssiger high fat Lieber-De-Carli Diät bei Ratten	+	+	Mitochondria-Schaden	-	-	+	Insulin	-	[38]
NASH-induzierende Diät	+	+	+	+	-	- Glucose-toleranz	+ TNF α		[88, 89]

Supplement 3: Vorläufige Daten zur Zelltransplantation bei chronischer Leberschädigung durch Alpha-1-Antitrypsinmangel



Darstellung des Nachweises von kollagenen Fasern (Sirius *red* Färbung, rot) und immunhistochemischer Nachweise aktivierter hepatischer Sternzellen mittels α SMA (braun) 7 Tage nach Zelltransplantation im Mausmodell des chronischen Alpha-1-Antitrypsinmangel in der PIZ-Maus. In der Abbildung wird die Behandlung des Alpha-1-Antitrypsinmangel ohne (links) und mit (rechts) murinen hepatozytär differenzierten Stammzellen verglichen, wobei nach Zelltransplantation (rechts) weniger aktivierte Sternzellen (braun) und somit weniger kollagene Fasern zu finden waren. Bei den Nachweisen handelt es sich um Parallelschnitte, wobei die untere Bildreihe (α SMA, 40x) die Ausschnittsvergrößerungen (weißer Kasten) der oberen Bildreihen (α SMA, 10x und Sirius *red*) darstellt.

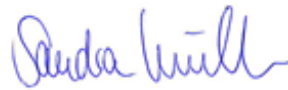
6 Selbstständigkeitserklärung

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.

.....
28.05.2014

Datum



.....

Unterschrift

7 Lebenslauf

Zur Person

Name	Winkler
Vorname	Sandra
Geburtsdatum	03. Dezember 1985
Geburtsort	Oschatz
Nationalität	deutsch

Tätigkeiten

Seit 11/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Arbeitsgruppe Prof. Christ, Angewandte Molekulare Hepatologie Universität Leipzig Thematik: Untersuchung Chronischer Lebererkrankungen (NASH, Alpha-1-Antitrypsin Mangel), Therapeutische Anwendung undifferenzierter/differenzierter humaner/muriner mesenchymaler Stammzellen, Hepatozelluläres Karzinom
11/2010-11/2011	Wissenschaftliche Mitarbeiterin Arbeitsgruppe Prof. Christ, Molekulare Hepatologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thematik: Untersuchung Chronischer Lebererkrankungen (NASH, Alpha-1-Antitrypsin Mangel), Therapeutische Anwendung differenzierter mesenchymaler Stammzellen
04/2010-09/2010	Assistent Arbeitsgruppe Prof. Christ, Molekulare Hepatologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Thematik: Zelltherapie bei Nicht-alkoholische Steatohepatitis im Modell der immundefizienten Maus

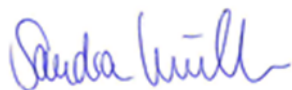
Studium

2004 - 2010	Studium der Ernährungswissenschaften Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Diplom im Fach Ernährungswissenschaften
-------------	---

Schulbildung

1996 - 2004	G.- E.- Lessing - Gymnasium Döbeln mit Abschluss Abitur
1992 - 1996	Grundschule „Am Holländer“ Döbeln

Leipzig, Mai 2014



Sandra Winkler

8 Publikationen

8.1 Originalarbeiten

- 1 **Winkler**, S.; Borkham-Kamphorst, E.; Stock, P.; Brückner, S.; Dollinger, M.; Weiskirchen, R.; Christ, B.
Human mesenchymal stem cells towards non-alcoholic steatohepatitis in an immunodeficient mouse model. *Exp Cell Res.* 2014
- 2 Stock, P.; Brückner, S.; **Winkler**, S.; Dollinger, M.; Christ, B.
Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-Derived Hepatocytes Improve the Mouse Liver after Acute Acetaminophen Intoxication by Preventing Progress of Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 2014 Apr 15, 7004-7028. doi: 10.3390/ijms15047004
- 3 Brückner, S.; Tautenhahn, H.M.; **Winkler**, S.; Stock, P.; Dollinger, M.M.; Christ, B.
A Fat Option for the pig: Hepatocytic Differentiated Mesenchymal Stem Cells for Translational Research. *Exp Cell Res.* 2014 Feb 15; 321 (2):267-75. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.10.018. Epub 2013 Nov 4
- 4 Brückner, S.; Tautenhahn, H.M.; **Winkler**, S.; Stock, P.; Jonas, S.; Dollinger, M.M.; Christ, B.
Isolation and Hepatocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells From Porcine Bone Marrow—"Surgical Waste" as a Novel MSC Source. *Transplant Proc.* 2013 Jun; 45 (5): 2056-8. doi: 10.1016/j.transproceed.2013.01.101.
- 5 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Christ, B.
A methionine-choline-deficient diet elicits NASH in the immunodeficient mouse featuring a model for hepatic cell transplantation. *Exp Cell Res.* 2012 Feb 1; 318 (3): 276-87

8.2 Übersichtsartikel

- 1 Christ, B.; **Pelz**, S.
Implication of hepatic stem cells in functional liver repopulation. *Cytometry A.* 2013 Jan; 83 (1): 90-102. doi: 10.1002/cyto.a.22232. Epub 2012 Nov 26. Review

8.3 Buchkapitel

- 1 **Winkler**, S.; Christ, B.
Treatment of NASH with human mesenchymal stem cells in the immunodeficient mouse.
Methods in Molecular Biology (submitted)

8.4 Vorträge

- 1 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S., Hempel, M.; Christ, B. (2013)
Zelltherapie bei monogenetischen Erkrankungen am Modell des α -1- Antitrypsinmangels
24. Workshop for experimental and clinical liver transplantation und hepatology, Wilsede 2013

- 2 Schüler, S.; **Pelz**, S.; Stock, P.; Kaufmann, R.; Böhmer, F.; Christ, B. (2013)
Geplantes Forschungsprojekt: Der Proteinase-aktivierte Rezeptor 2 in mesenchymalen Stammzellen – Bedeutung für die Entwicklung und Progression des hepatozellulären Karzinoms. *24. Workshop for experimental and clinical liver transplantation und hepatology, Wilsede 2013*
- 3 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Temporary changes of mouse MSC stem cell marker expression during hepatocyte differentiation. *17. Leipziger Workshop Cytomics Leipzig, March 2012*
- 4 **Pelz**, S. (2012)
Changes of mouse MSC stem cell marker expression during hepatocyte differentiation - An option for alpha-1-antitrypsin treatment. *eALTA Network Meeting Frankfurt, June 2012*
- 5 Christ, B.; **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel, M. (2012)
Transplantation of stem cell-derived hepatocyte-like cells ameliorates NASH in an immunodeficient mouse model. *Science Research Conference: Liver biology: Fundamental Mechanisms & Translational Applications, Snowmass 2012*
- Pelz**, S. (2011)
- 6 Therapeutic potential of adult stem cell-derived hepatocytes in alpha-1-antitrypsin deficiency.
Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Highlights from the 2011 European Respiratory Society Annual Congress Amsterdam, September 2011 Grifols Symposium
- 7 **Pelz**, S.; Stock, P.; Ebensing, S.; Hempel, M.; Richter, K.; Brückner, S.; Christ, B. (2010)
Zelltherapie bei Nicht alkoholischer Steatohepatitis (NASH) im Modell der immundefizienten Maus. *21. Workshop for experimental and clinical liver transplantation und hepatology, Wilsede 2010.*
- 8 **Pelz**, S.; Stock, P.; Ebensing, S.; Hempel, M.; Richter, K.; Brückner, S.; Dollinger M.M.; Christ, B. (2010)
Zelltherapie mit hepatozytär differenzierten mesenchymalen Stammzellen bei der nicht alkoholischer Steatohepatitis (NASH) im immundefizienten Mausmodell. *DGVS Stuttgart, Z Gastroenterol, 48: 866*
- 9 **Pelz**, S. (2010)
Therapeutic potential of adult stem cell-derived hepatocytes in alpha-1-antitrypsin deficiency.
Alpha-1 Antitrypsin Deficiency Highlights from the 2010 European Respiratory Society Annual Congress Barcelona, September 2010 Talecris Biotherapeutics Symposium

8.5 Poster-Präsentationen

- 1 Hempel, M.; **Winkler**, S.; Christ, B. (2014)
Dynamics of E-Cadherin Zonation in a Mouse Model of NASH. *5th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells*
- 2 **Winkler**, S.; Brückner, S.; Stock, P.; Hempel, M.; Christ, B. (2014)
Hepatogenic differentiated murine mesenchymal stem cells display functional qualities of perivenous and/or periportal hepatocytes. *Z Gastroenterol; 52, DOI: 10.1055/s-0033-1360975*

- 3 Brückner, S.; Tautenhahn, M.; **Winkler**, S.; Stock, P.; Dollinger, M.; Christ, B. (2014)
Hepatocytic Differentiated Mesenchymal Stem Cells for Translational Research in the Pig. *Z Gastroenterol*; 52, DOI: 10.1055/s-0033-1360974
- 4 **Pelz**, S.; Brückner, S.; Stock, P.; Hempel, M.; Christ, B. (2013)
Hepatogene Differenzierung von murinen mesenchymalen Stammzellen als Zelltherapeutikum bei chronischen Lebererkrankungen. *Z Gastroenterol*; 51
- 5 Brückner, S.; **Pelz**, S.; Zipprich, A.; Hempel, M.; Stock, P.; Christ, B. (2013)
Systemisch applizierte mesenchymale Stammzellen vermindern die Fibrose im Rattenmodell der CCl4-induzierten Leberzirrhose. *Z Gastroenterol*; 51
- 6 Stock, P.; Brueckner, S.; Tautenhahn, H.M.; **Pelz**, S.; Hempel, M.; Christ, B. (2013)
Mesenchymal stem cells (MSC) from porcine bone marrow (pBM) of the Os femoris and the Crista iliaca. *FASEB JOURNAL* 27
- 7 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel, M.; Christ, B. (2013)
Transplantation of stem cell-derived hepatocyte-like cells ameliorates NASH in an immunodeficient mouse model. *Luxemburg EASL monothematic conference 2013*
- 8 **Winkler**, S.; Brückner, S.; Stock, P.; Hempel, M.; Christ, B. (2013)
Hepatogenic differentiation of murine mesenchymal stem cell as therapeutic strategy in chronic Liver diseases. *12th Congress of Cell Transplantation Society Maastrand*
- 9 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Charakterisierung und hepatozytäre Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe der immundefizienten Maus. *Z Gastroenterol*; 50, DOI: 10.1055/s-0031-1295868
- 10 Dollinger, M.M.; Brückner, S.; Tautenhahn, H.M.; **Pelz**, S.; Thonig, A.; Hempel, M.; Stock, P.; Christ, B. (2012)
Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks aus dem Os femoris und der Crista iliaca im Schwein. *Z Gastroenterol*; 50
- 11 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Characterization and hepatocyte-like differentiation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue of immunodeficient mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 185. pp. A4121
- 12 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Characterization of differentiated mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue of immunodeficient mice. *International Liver CongressTM 2012 by EASL Congress Barcelona; Journal of Hepatology* 56, S73
- 13 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Transplantation of stem cell-derived hepatocyte-like cells ameliorates NASH in an immunodeficient mouse model. *4th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells*
- 14 **Pelz**, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in immunodeficient mice: A model for xenogeneic stem cell transplantation. *4th Conference on Systems Biology of Mammalian Cells*

- 15 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from adipose tissue of immunodeficient mice. *XXIV TTS Congress – Berlin 2012*
- 16 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Characterization and hepatocyte-like differentiation of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue of immunodeficient mice. *European Respiratory Society Annual Congress Wien 2012*
- 17 Dollinger, M.M.; Brückner, S.; Tautenhahn, H.M.; **Pelz, S.**; Stock, P., Christ, B. (2012)
Differentiation of bone marrow and adipose tissue derived porcine mesenchymal stem cells into hepatocytes. *2012 AASLD Annual Meeting; HEPATOLOGY 56, 324A-325A*
- 18 Tautenhahn H.M.; Brueckner, S.; **Pelz, S.**; Stock, P.; Dollinger, M.M.; Christ, B. (2012)
Isolation and Hepatocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells (MSC) from Porcine Bone Marrow-'Surgical Waste' as a Novel MSC Source. *AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION 13, 241-241 2013*
- 19 Stock, P.; Dollinger, M.M.; Brückner, S.; Tautenhahn, H.M.; **Pelz, S.**; Christ, B. (2012)
Mesenchymal Stem Cells from Porcine Bone Marrow of the Os Femoris and the Crista Iliaca: 2468. *Transplantation 94, 596 2012*
- 20 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel, M.; Christ, B. (2012)
Hepatocyte Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue of Immuno-deficient Mice: 2469. *Transplantation 94, 583*
- 21 **Pelz, S.**; Stock, P.; Hempel, M.; Brückner, S.; Richter, K.; Christ, B (2011)
Die Rolle des mikrosomalen Triglyzeridtransferprotein (MTTP) bei nahrungsinduzierter NASH im Mausmodell. *Z Gastroenterol; 49; DOI: 10.1055/s-0030-1269582*
- 22 Brückner, S; **Pelz, S.**; Stock, P; Ebensing, S; Hempel, M; Richter, K; Christ, B (2011) Nachweis und Quantifizierung transplantiertes, hepatozytär differenzierter, humaner mesenchymaler Stammzellen bei NASH in der immundefizienten Maus. *Z Gastroenterol; 49; DOI: 10.1055/s-0030-1269620*
- 23 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel, M.; Christ, B. (2011)
Antiinflammatorische Eigenschaften von hepatozytär differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen bei NASH im Mausmodell. *22. Workshop for experimental and clinical liver transplantation und hepatology, Wilsede 2011.*
- 24 **Pelz, S.**; Stock, P.; Ebensing, S.; Hempel, M.; Brückner, S.; Richter, K.; Christ, B. (2011)
The decrease of MTTP expression might support the development of NASH in mice. *FASEB J March 17, 2011 25:794.1*
- 25 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2011)
Human stem cell-derived hepatocyte-like cells alleviate NASH in an immunodeficient mouse model. *DGVS Spring Conference Berlin 2011*
- 26 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2011)
Transplantation of stem cell-derived hepatocytes improves NASH in an immunodeficient mouse model. *EASL Monothematic Conference, Petersberg*

- 27 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2011)
Hepatozytär differenzierte Zellen verbessern die nahrungsinduzierte NASH in immun-defizienten Mäusen. *Z Gastroenterol* 2011; 49 DOI: 10.1055/s-0031-1285677
- 28 **Pelz, S.**; Stock, P.; Brückner, S.; Richter, K.; Ebensing, S.; Hempel, M.; Christ, B. (2010) Nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH) in der immundefizienten Maus – Ein Modell für die xenogene Stammzelltransplantation. *Z Gastroenterol*; 48: 181
- 29 **Pelz, S.**; Stock, P.; Ebensing, S.; Hempel, M.; Richter, K.; Brückner, S.; Christ, B. (2010) Improvement of diet-induced NASH by stem cell-derived hepatocytes in an immunodeficient mouse model. *Cytomics*, 15. *Leipziger Workshop 2010*; will be published in *Cytometry Part B*
- 30 Stock, P.; **Pelz, S.**; Ebensing, S.; Hempel, M.; Richter, K.; Brückner, S.; Christ, B. (2010) Immunodeficient mice - A suitable model for cell transplantation in non- alcoholic steatohepatitis (NASH). *FASEB J.* 24, 236.5
- 31 Stock, P.; **Pelz, S.**; Ebensing, S.; Hempel, M.; Richter, K.; Brückner, S.; Christ, B. (2010) Nutritional Induction of NASH in Immunodeficient Mice as a Model for Stem Cell Transplantation. *American Journal of Transplantation Special Issue: 2010 American Transplant Congress Volume 10, Issue Supplement s4, pages 213–571, April 2010*
- 32 **Pelz, S.**; Stock, P.; Hempel M.; Ebensing S.; Richter K.; Christ B. (2009) Nonalcoholic Steatohepatitis in immunodeficient mice. *Regen Med*; Vol. 4 (6): 248

8.6 Auszeichnungen

1 **EASL Young Investigators Bursary 2012**

Pelz, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2012)
Characterization of differentiated mesenchymal stem cells obtained from adipose tissue of immunodeficient mice. *International Liver Congress™ 2012 by EASL Congress Barcelona*

2 **Poster Award DGVS Jahrestagung Leipzig 2011**

Pelz, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B. (2011)
Hepatozytär differenzierte Zellen verbessern die nahrungsinduzierte NASH in immun-defizienten Mäusen. *DGVS Jahrestagung 2011, Leipzig*

3 **EASL Young Investigators Bursary 2011**

Pelz, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B.
Transplantation of stem cell-derived hepatocytes improves NASH in an immunodeficient mouse model. *EASL Monothematic Conference 2011, Petersburg*

4 **Poster Award DGVS Spring Conference Berlin 2011**

Pelz, S.; Stock, P.; Brückner, S.; Hempel M., Christ B.
Human stem cell-derived hepatocyte-like cells alleviate NASH in an immunodeficient mouse model. *DGVS Spring Conference Berlin 2011*

5 ***European Alpha-1-Antitrypsin Laurell's Training Award (eALTA Award) 2011***

Pelz, S.

Therapeutic potential of adult stem cell-derived hepatocytes in alpha-1-antitrypsin deficiency.

ERS Congress Barcelona 2011

6 ***Abraham D. Sobel 2010 ASIP Educational Fund Scholar***

Stock, P.; **Pelz, S.**; Ebensing, S.; Hempel, M.; Richter, K.; Brückner, S.; Christ, B. (2010) Immunodeficient mice - A suitable model for cell transplantation in non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *FASEB J.* 24, 236.5

9 Danksagung

Dank gebührt allen denen, die mir während meiner Arbeit in den letzten Jahren tatkräftig zur Seite standen und mich in jeglicher Form unterstützt haben.

Als erstes möchte ich mich im Besonderen bei Herrn Prof. Dr. Bruno Christ bedanken, einerseits für die Überlassung des spannenden Themas sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und andererseits für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowohl in Halle als auch in Leipzig. Vielen Dank für die kurzen und langen, manchmal auch anstrengenden, wissenschaftlichen und privaten Diskussionen sowie für die stets ehrlichen Worte.

Ein riesiges Dankeschön gehört Madlen Hempel, die immer einen Plan hat und immer weiß, wie es weiter geht, denn es geht irgendwie immer weiter. Vielen Dank für die Unterstützung in den Versuchen, bei der Versuchsplanung und für alles andere, was wir seit 2009 zusammen machen konnten. Ohne dich wären wir nicht nur im Labor manchmal echt aufgeschmissen.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. Corinna Dietel und Dr. Peggy Stock für die wissenschaftliche Betreuung sowie bei Antje Thonig und Sandra Brückner für seelische und moralische Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Weiskirchen und Dr. Erawan Borkham-Kamphorst von der RTWH Universitätsklinik Aachen und PD Dr. Dollinger vom Universitätsklinikum Ulm für die Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke meinen Freunden, vor allem Hagen Kühne und Yvonne Wetzig, die mich in Halle von Anfang an begleitet haben und immer da waren.

Der größte Dank, in jeglicher Hinsicht, gebührt meinen Eltern, meinen Geschwistern und Omi und Opi für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Und ganz besonders möchte ich mich bei Karsten, der alles mitgemacht hat, mich manchmal mit seiner Meinung auf den Boden der Tatsachen zurückgeholt hat, gelegentliche Missstimmungen ertragen musste und der zusammen mit Selmi einfach immer für mich da ist, bedanken!