

Aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Hepatobiliäre Chirurgie und Transplantationschirurgie
(Direktor Prof. Dr. med. B. Nashan)

**Phänotypische und funktionelle
Charakterisierung zirkulierender Stammzellen
im Rahmen leberchirurgischer Eingriffe**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Alice Münster geboren in Dresden

Hamburg 2011

**Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 30.06.2011
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss:	der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. M. Sterneck
	2. Gutachter/in:	PD Dr. C. Lange
	3. Gutachter/in:	PD Dr. J.-M. Pollok

Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis	1
1	Zielsetzung	5
2	Zusammenfassung	6
3	Einleitung	8
3.1	Definition einer Stammzelle	8
3.1.1	Hierarchie der hämatopoetischen Stammzellen	10
3.2	Entwicklungsgeschichtliche Beziehung zwischen Hämatopoese und der Leber	11
3.3	Zelloberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation)	12
3.3.1	Stammzellantigene	12
3.3.2	Hämatopoetische Antigene	15
3.4	Zelluläre Mechanismen der Leberregeneration.....	16
3.4.1	Regeneration durch Hepatozyten	17
3.4.2	Regeneration durch intrahepatische Progenitorzellen	18
3.4.3	Regeneration durch intrahepatische Stammzellen	19
3.4.4	Regeneration durch Stammzellen aus dem Knochenmark.....	20
4	Material und Methoden	25
4.1	Versuchsplanung.....	25
4.2	Klinische Daten der Versuchspersonen	25
4.3	Durchflusszytometrische Analysen	28
4.3.1	Versuchsanordnung.....	30
4.3.2	Gewinnung und Vorbereitung der Blutproben	31
4.3.3	Messung der Blutproben am FACS Gerät.....	31
4.4	Analyse von hämatopoetischen und endothelialen Kolonien (Colony Assays)	32
4.4.1	Versuchsanordnung.....	33
4.4.2	Vorbereitung der Colony Assays.....	33
4.4.3	Analyse des koloniebildenden Potentials	33
4.5	Geräte und Materialien	34
4.5.1	Puffer und Medien	34
4.5.2	Bezugsquellen der Geräte und Materialien	35
4.6	Graphische Darstellung und statistische Methoden	39
5	Ergebnisse	40
5.1	Durchflusszytometrische Analysen	40
5.1.1	Quantifizierung und Phänotypisierung CD133-positiver Zellen	40
5.1.2	Mobilisierung CD34-positiver Zellen.....	45
5.1.3	Expression der Stammzellmarker c-kit und brcp-1	46
5.1.4	Mobilisierung CD14-positiver Zellen.....	50
5.1.5	Mobilisierung CXCR4-positiver Zellen.....	52
5.1.6	Korrelation der Mobilisierung CD133-, c-kit- und brcp-1-positiver Zellen.....	54
5.1.7	Vergleich der Mobilisierungsverläufe nach partieller Hepatektomie bei Patienten mit Lebererkrankungen und Leberlebendspendern	54
5.2	Evaluierung des koloniebildenden Potentials zirkulierender Leukozyten.....	55

5.2.1	Analyse hämatopoetischer Kolonien.....	55
5.2.2	Analyse endothelialer Kolonien.....	60
6	Diskussion.....	64
6.1	Durchflusszytometrische Ergebnisse.....	65
6.1.1	Mobilisierung CD133-positiver Zellen.....	65
6.1.2	Mobilisierung CD34-positiver Zellen.....	70
6.1.3	Mobilisierung c-kit-positiver Zellen.....	70
6.1.4	Mobilisierung brcp-1-positiver Zellen.....	72
6.1.5	Mobilisierung CD14-positiver Zellen.....	73
6.2	Vergleich des koloniebildenden Potentials.....	74
6.3	Schlussfolgerung.....	78
7	Literaturverzeichnis.....	80
8	Danksagung.....	102
9	Anhang.....	103
9.1	Tabellen zu Ergebnissen der Durchflusszytometrie (zu Kapitel 5.1).....	103
9.1.1	Tabellen zu den Darstellungen der zeitlichen Verläufe.....	103
9.1.2	Tabellen der statistischen Korrelation (zu Kapitel 5.1.6).....	110
9.1.3	Tabellen der statistischen Daten (zu Kapitel 5.1.7).....	113
9.2	Tabellen zu Ergebnissen des Colony Assays (zu Kapitel 5.2).....	114
9.3	Genehmigung von Becton Dickinson GmbH.....	117
9.4	Eidesstattliche Erklärung.....	118

I **Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	<u>Ab</u> bildung
ABCG-2	<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette sub-family <u>G</u> member <u>2</u>
ABC-Transporter	<u>A</u> TP <u>b</u> inding <u>c</u> assette <u>t</u> ransporter
AFP	<u>a</u> lpha <u>F</u> etoprotein
Aqua dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata - destilliertes Wasser
atyp	<u>a</u> typische
BFU-E	<u>b</u> urst <u>f</u> orming <u>u</u> nit <u>e</u> rythrocyte - sehr unreife koloniebildende Einheit für Erythrozyten
bcrp-1	<u>b</u> reast <u>c</u> ancer <u>r</u> elated <u>p</u> rotein 1 - Brustkrebs assoziiertes Protein
bzgl.	<u>b</u> ezüg <u>l</u> ich
bzw.	<u>b</u> e <u>z</u> iehu <u>ng</u> s <u>w</u> eise
ca.	<u>c</u> ir <u>ca</u>
CCl ₄	Tetrachlormethan
CD	<u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation - System zur Bezeichnung zellulärer Differenzierungsantigene
CFU-...	<u>c</u> olony <u>f</u> orming <u>u</u> nit - koloniebildende Einheit für
-Baso	<u>b</u> asophile - Basophile
-E	<u>e</u> rythrocyte - Erythrozyten
-EC	<u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell - Endothelzellen
-EC-like	<u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>l</u> ike - Endothelzellen ähnlicher
-Eo	<u>e</u> osinophile - Eosinophile
-G	<u>g</u> ranulocyte - Granulozyten
-GEMM	<u>g</u> ranulocyte <u>e</u> rythrocyte <u>m</u> onocyte <u>m</u> egakaryocyte - Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten
-GM	<u>g</u> ranulocyte <u>m</u> onocyte - Granulozyten und Monozyten
-M	<u>m</u> onocyte - Monozyten
-M-like	<u>m</u> onocyte <u>l</u> ike - Monozyten ähnlicher
CO ₂	Kohlendioxid
Corp	<u>C</u> orporation - Körperschaft
CSF	<u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor - Kolonie stimulierender Faktor
D	<u>D</u> eutschland
d	Tag
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleins <u>ä</u> ure

EDTA	<u>E</u> thylend <u>ia</u> min <u>tetra</u> essigsäure (-säure: - <u>a</u> cid)
EGF	<u>e</u> pidermal <u>g</u> rowth <u>f</u> actor - epidermaler Wachstumsfaktor
et al.	<u>e</u> t <u>a</u> lli - und andere
EPO	<u>E</u> rythro <u>p</u> o <u>e</u> tin
FACS	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter - Fluoreszenz-aktiviertes Zellanalysegerät, Durchflusszytometer
FAH	<u>F</u> umaryl <u>a</u> cetoacetat <u>H</u> ydrolase
FITC	<u>F</u> luorescein <u>I</u> sothio <u>c</u> yanat
FSC	<u>f</u> orward <u>s</u> catter - Vorwärtsstreulicht
g	<u>G</u> ramm
G-CSF	<u>g</u> ranulocyte <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor - Granulozyten stimulierender Wachstumsfaktor
GM-CSF	<u>g</u> ranulocyte <u>m</u> onocyte <u>c</u> olony <u>s</u> timulating <u>f</u> actor - Granulozyten und Monozyten stimulierender Wachstumsfaktor
h	Stunde
HGF	<u>h</u> epatocyte <u>g</u> rowth <u>f</u> actor - Hepatozyten stimulierender Wachstumsfaktor
HSZ	<u>h</u> ämatopoetische <u>S</u> tamm <u>z</u> elle/n
IgG1/IgG2	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u> amma 1/ <u>I</u> mmunglobulin <u>G</u> amma 2
IL-1 β , -3, -6	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin 1 beta, 3, 6
IMDM	<u>I</u> scove's <u>M</u> odified <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> edium
KCl	Kaliumchlorid
KDR	<u>k</u> inase insert <u>d</u> omain <u>r</u> eceptor
KHCO ₃	Kaliumhydrogenkarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KM	<u>K</u> nochen <u>m</u> ark
L	<u>L</u> iter
LBP	<u>L</u> ipopolysaccharid <u>b</u> indendes <u>P</u> rotein
LCA	<u>l</u> eukocyte <u>c</u> ommon <u>a</u> ntigen - gemeinsames Leukozytenantigen
Lymphoz.	<u>L</u> ymphozyten
LLS	<u>L</u> eber <u>l</u> ebend <u>s</u> pender
LPS	<u>L</u> ipopolysaccharid
LR	<u>L</u> eber <u>r</u> esektion
mCD14	<u>m</u> embran-gebundenes <u>CD14</u>
min.	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
MNC	<u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells - mononukleäre Zellfraktion

MoAb	<u>monoclonal antibodies</u> - monoklonale Antikörper
MOMC	<u>monocyte derived multipotential cells</u> - von Monozyten abstammende multipotente Zellen
Monozyt.	<u>Monozyten</u>
mRNS	<u>messenger</u> (Boten) <u>Ribonukleinsäure</u>
MW	arithmetischer <u>Mittelwert</u>
n	Stichprobengröße
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O	Natriumphosphatlösung
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NK-Zelle	<u>natürliche Killerzelle</u>
Nr.	<u>Nummer</u>
o.g.	<u>oben genannt/genannt</u>
P	<u>probability</u> - Wahrscheinlichkeit
PBS	<u>phosphate buffered saline</u> - phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	<u>Phycoerythrin</u>
prä OP	<u>präoperativ</u>
post OP	<u>postoperativ</u>
PTPRC	<u>protein tyrosin phosphatase receptor type C</u> - Protein Tyrosinphosphatase vom Rezeptor Typ C
rh	<u>recombinant human</u>
rpm	<u>rounds per minute</u> – Umdrehungsgeschwindigkeit
sCD14	<u>soluble CD14</u> – lösliches CD14
SCF	<u>stem cell factor</u> - Stammzellefaktor
SCGF	<u>stem cell growth factor</u> - Stammzell Wachstumsfaktor
SCID	<u>severe combined immune deficiency</u> - schwerer kombinierter Immundefekt
SDF-1	<u>stromal cell-derived factor-1</u> – stromalzell-abgeleiteter Faktor
sec.	Sekunde
SEM	<u>standard error of the mean</u> - mittlere Standardabweichung
Src	<u>sarcoma</u>
SSC	<u>side scatter</u> - Seitwärtsstreulicht
TGF-α	<u>transforming growth factor alpha</u> - transformierender Wachstumsfaktor alpha
TLR	<u>toll-like receptor</u> - signaltransduktions-vermittelnder Rezeptor
TNF-α	<u>tumor necrosis factor alpha</u> - Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	<u>unter anderem</u>

USA	<u>U</u> nited <u>S</u> tates of <u>A</u> merica - Vereinigte Staaten von Amerika
V	<u>V</u> olumen
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor - vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR-2	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>r</u> eceptor 2 - vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
μl	Mikroliter
%	Prozent
°C	Grad Celsius

1 Zielsetzung

Eine Lebertransplantation ist zurzeit die einzige Therapieoption für Patienten im Endstadium chronischer Lebererkrankungen und bei akutem Leberversagen. Wegen der begrenzten Anzahl von Spenderorganen wurde die Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit fokussiert, Lebergewebe und -funktion durch Transplantation allogener Hepatozyten oder autologer Stammzellen wiederherzustellen. Auch die Verwendung in vitro differenzierter embryonaler oder fetaler Stammzellen stellt eine alternative Möglichkeit regenerativer Therapien dar, aber die Risiken der Abstoßung oder der Entwicklung von benignen oder malignen Keimzelltumoren sowie ethische Aspekte limitieren diese Ansätze für eine erfolgreiche und sichere Therapie. Autologe Stammzellen des Knochenmarks könnten hingegen geeignet sein, um die Leberregeneration zu stimulieren. Entgegen extensiver Untersuchungen der hepatischen Regeneration in verschiedenen Situationen der Leberschädigung ist nur wenig über die Mechanismen der Leberregeneration im humanen System bekannt.

Derzeit wird diskutiert, dass die Leberregeneration sowohl über reife Hepatozyten als auch über intrahepatische und extrahepatische Stamm- und Progenitorzellen vermittelt wird. Dabei scheinen die extrahepatischen Stammzellen im Knochenmark angesiedelt zu sein und über die Blutzirkulation in die Leber zu gelangen. In diesem Zusammenhang zeigte eine Studie von Gehling et al. aus unserem Forschungslabor eine Mobilisierung myelomonozytärer Progenitorzellen mit hämatopoetischem Phänotyp und hämatopoetischem und hepatozytärem Differenzierungspotential nach partieller Hepatektomie [Gehling et al. 2005].

Basierend auf der Hypothese, dass Progenitorzellen des Knochenmarks zur Leberregeneration nach partieller Hepatektomie bei gesunden Leberspendern beitragen, und dass diese Zellen in das periphere Blut mobilisiert werden, um über die Zirkulation in die Leber einzuwandern, sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Kommt es auch bei Patienten, die sich einer Leberresektion oder einer Pfortaderembolisation unterziehen müssen, zu einer postoperativen bzw. postinterventionellen Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen?
2. Unterscheiden sich die durch Leberresektion und Pfortaderembolisation mobilisierten Stamm- und Progenitorzellen von den durch eine partielle Hepatektomie mobilisierten Progenitorzellen hinsichtlich des Phänotyps?
3. Unterscheiden sich die mobilisierten Progenitorzellpopulationen der verschiedenen Kollektive im Hinblick auf funktionelle Eigenschaften in vitro?

2 Zusammenfassung

Zahlreiche experimentelle Studien der vergangenen Jahre weisen daraufhin, dass Stammzellen des Knochenmarks an der Regeneration der Leber beteiligt sein könnten. In Studien wurden definierte Stammzellpopulationen aus dem Knochenmark isoliert und Mäusen oder Ratten intravenös injiziert. Diese Stammzellpopulationen hatten einen hämatopoetischen Phänotyp und waren in der Lage, sowohl das Knochenmark als auch die Leber zu besiedeln und sich damit zu Blutzellen als auch zu Hepatozyten zu differenzieren. Neueste Studien zeigen, dass insbesondere aus dem Knochenmark stammende monozytäre Zellen die Fähigkeit besitzen, eine geschädigte Leber zu besiedeln und einen hepatozytären Phänotyp anzunehmen. Diese Zellen, auch myelomonozytäre Zellen genannt, scheinen dabei auch als bereits determinierte Progenitorzellen an der Leberregeneration beteiligt zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei Patienten nach Leberresektion und bei Gesunden nach Leberlebendspende Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut freigesetzt werden und welchen Phänotyp und welche Differenzierungsfähigkeit diese Zellen besitzen. Dazu wurden bei Leberlebendspendern und Patienten mit Lebererkrankungen prä- und postoperative durchflusszytometrische Analysen des peripheren Blutes durchgeführt. Zur Detektion der zirkulierenden Progenitorzellen wurden Antikörper gegen die Stammzellantigene CD133, CD34, c-kit und bcrp-1 eingesetzt und zur weiteren Phänotypisierung Antikörper gegen hämatopoetische Antigene CD45, CD14 und gegen den Chemokin Rezeptor CXCR4 verwendet. Ferner wurde das klonogene Potenzial der zirkulierenden Progenitorzellen mittels Colony Assays ermittelt.

Bei diesen Analysen ließ sich eine deutliche Mobilisierung von CD133-positiven (⁺) Zellen, sowie von CD133⁺/CD14⁺, CD133⁺/CXCR4⁺, CD14⁺, c-kit⁺ und c-kit⁺/CXCR4⁺ Zellen bereits vor Leberresektion bei lebererkrankten Patienten nachweisen. Bei den Lebendspendern war eine Mobilisierung der gleichen Zellpopulation hingegen vor allem nach der Leberspende detektierbar. Es konnte gezeigt werden, dass vermehrt nach Leberlebendspende jedoch nicht nach Leberresektion CD133⁺ Progenitorzellen in das periphere Blut mobilisiert werden. CD34⁺ und bcrp-1⁺ Zellen wurden in beiden Kollektiven nur in sehr geringem Ausmaß mobilisiert.

Mittels o.g. Colony Assays konnte demonstriert werden, dass es nach Leberlebendspende zu einer Zunahme hämatopoetischer, insbesondere monozytärer

und erythrozytärer, sowie endothelialer Progenitoren kommt. Dieses Phänomen war nach Resektion einer erkrankten Leber nicht nachweisbar.

Weiterhin gibt der Nachweis c-kit⁺ Zellen, zusammen mit der vermehrten Bildung von CFU-E, sowie c-kit⁺/CXCR4⁺ und CXCR4⁺ Zellen Grund zu der Annahme, dass eine Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen unter anderem durch eine intrahepatische Hypoxie gesteuert und mittels SDF-1 von verletztem Gewebe angelockt werden könnte.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate weisen daraufhin, dass die Rekrutierung von Stammzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut einen relevanten physiologischen Prozess im Falle von endogener sowie exogener Schädigung der Leber darstellt, und unterstreichen die potentielle Rolle von Stammzellen für die Therapie von Lebererkrankungen.

3 Einleitung

3.1 Definition einer Stammzelle

Eine Stammzelle ist definiert als eine undifferenzierte Zelle, die sich zum einen selbst erneuern und darüber hinaus zu spezialisierten Zellen (Progenitorzellen) ausdifferenzieren kann. Aus einer Zellteilung können eine Stammzelle und eine Progenitorzelle hervorgehen. Dieses Phänomen wird als asymmetrische Zellteilung bezeichnet und stellt eine stammzellspezifische Eigenschaft dar (Abbildung 3.1).

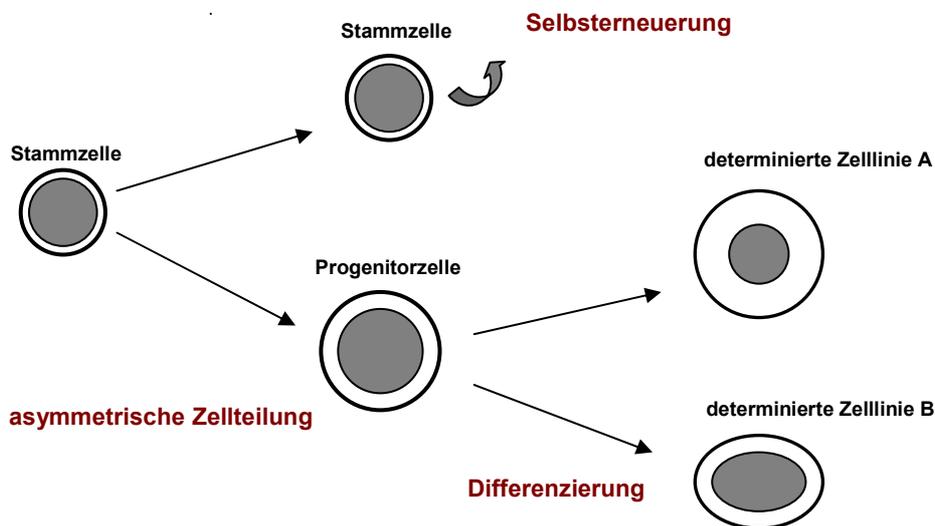


Abb. 3.1: Definition einer Stammzelle. Eine Stammzelle ist eine undifferenzierte Zelle, die sich selbst erneuern sowie Progenitorzellen hervorbringen kann.

Stammzellen lassen sich durch ihr ontogenetisches Alter und dem damit verknüpften Differenzierungspotential unterscheiden. Eine Stammzelle kann totipotent, pluripotent, multipotent oder oligopotent sein. Totipotente Stammzellen besitzen ein unbegrenztes Differenzierungspotential. Sie können zu allen Gewebstypen eines Organismus ausreifen und somit einen neuen Organismus bilden. Nur eine befruchtete Eizelle und Zellen der ersten Zellteilungen bis zum Achtzellstadium besitzen dieses Potential. Ist das Stadium der Blastozyste erreicht, so bezeichnet man das Zellpotential als pluripotent. Die Zellen der Blastozyste werden auch als embryonale Stammzellen bezeichnet und besitzen die Fähigkeit, sich zu primitiven Keimstammzellen sowie zu

somatischen Stamm- und Progenitorzellen (Vorläuferzellen) zu entwickeln. Progenitorzellen können sich ebenso wie Stammzellen in verschiedene Gewebe ausdifferenzieren, haben jedoch die Fähigkeit der Selbsterneuerung verloren. Pluripotente embryonale Stammzellen können sich zu jedem Zelltyp eines Organismus differenzieren, jedoch sind sie im Gegensatz zu totipotenten Zellen nicht mehr in der Lage, einen gesamten Organismus zu bilden. Multipotente Stammzellen treten in nahezu allen Geweben des Menschen auf. Sie kommen im embryonalen, fetalen und erwachsenen Organismus vor und können sich in verschiedene spezifische Gewebszellen differenzieren und übernehmen dabei wichtige Reparatur- und Erneuerungsfunktionen. Im postnatalen Organismus werden diese Zellen als adulte Stammzellen bezeichnet. Aus ihnen werden während der gesamten Lebensdauer des Organismus neue spezialisierte Zellen gebildet [zusammengefasst aus Engelhardt et al. 2003, Morrison et al. 1997, Schöler 2007]. Adulte Stammzellen finden sich vorwiegend im Knochenmark. Es lassen sich hier Stammzellen des blutbildenden Systems (hämatopoetische Stammzellen), Blutgefäßstammzellen (endotheliale Stammzellen) und Stammzellen des Stützgewebes (mesenchymale Stammzellen) nachweisen. Der Anteil hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen gemessen an den Gesamtzellen beträgt im Knochenmark eines gesunden Erwachsenen ca. 0,5-2% und im peripheren Blut unter 0,5% [Barnes et al. 1967]. Der Anteil endothelialer Progenitorzellen in Knochenmark und peripherem Blut ist deutlich geringer, eine genaue Quantifizierung ist allerdings schwierig, da endotheliale Progenitorzellen einen ähnlichen Phänotyp wie hämatopoetische Stammzellen aufweisen [Rafii und Lyden 2003]. Mesenchymale Stammzellen kommen unter physiologischen Umständen nur im Knochenmark vor und machen hier einen Anteil von 0,01 - 0,05 % aus [Minguell et al. 2001]. Hämatopoetische Stammzellen wurden bereits in weiteren Organen nachgewiesen. Sie sollen beispielsweise auch im Muskel vorkommen [Dell'Agnola et al. 2002, Jackson et al. 1999, Kadawa und Ogawa 2001], und wurden in der Leber detektiert [Körbling et al. 2002, Wang, Ge et al. 2003].

Als oligopotent bezeichnet man Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in wenige verschiedene Zelltypen innerhalb eines Gewebes differenzieren zu können. Diese Eigenschaften besitzen beispielsweise lymphoide oder myeloide Vorläuferzellen [Schöler 2007].

3.1.1 Hierarchie der hämatopoetischen Stammzellen

Je höher eine Zelle in der Hierarchie der hämatopoetischen Zellkaskade steht, desto potenter ist sie verglichen mit untergeordneten Zellen in Bezug auf die Selbsterneuerungs-, Teilungs- (im adulten Organismus teilen sich unreife Stammzellen seltener als reifere) und Differenzierungsfähigkeit. An der Spitze der hämatopoetischen Zellhierarchie stehen im adulten Organismus multipotente Stammzellen. Aus ihnen können sich alle Zellreihen der myeloischen und lymphatischen Hämatopoese entwickeln (Abbildung 3.2). Auf der nächsten Ebene werden ihnen die myeloischen und lymphatischen oligopotenten Stamm- und Progenitorzellen untergeordnet. Diese oligopotenten Stamm- und Progenitorzellen werden auch als koloniebildende Einheiten (CFU: colony forming unit) bezeichnet, weil sie nach Einbringen in eine semisolide Matrix sog. Kolonien bilden können. Bei den Kolonien handelt es sich um Zellklone, die ihrerseits aus einer oder mehrerer, für eine bestimmte hämatopoetische Zellreihe determinierte Progenitorzellpopulation bestehen. Wachstumsfaktoren (colony stimulating factors: CSF), wie der vaskuläre Wachstumsfaktor (VEGF) oder der hepatische Wachstumsfaktor (HGF) üben dabei einen stimulierenden Effekt auf Proliferation und Differenzierung der CFU-bildenden Zellen aus. Je nach Differenzierungsgrad bzw. Differenzierungspotential einer CFU-bildenden Zelle können CFUs nur einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen gebildet werden. Im Hinblick auf myeloische CFU-bildende Zellen unterscheidet man erythrozytäre Kolonien, so genannte burst forming unit erythrocyte (BFU-E) und colony-forming unit erythrocyte (CFU-E), gemischte Kolonien wie colony-forming unit granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte (CFU-GEMM) und myelomonozytäre Kolonien als CFU- granulocyte monocyte (CFU-GM), granulocyte (CFU-G) und monocyte (CFU-M). Eine myeloische und eine lymphoide CFU kann sich wiederum zu bi- oder unipotenten Progenitoren weiter differenzieren, aus denen sich daraufhin die morphologisch unterscheidbaren Vorstufen der verschiedenen Blutzellreihen bilden können.

Verschiedene in vivo und in vitro Systeme wurden entwickelt, um Stammzellen und Progenitoren zu detektieren und ihr Differenzierungspotential zu beurteilen. Koloniebildende Zell-Ansätze (Colony Assays) können beispielsweise verwendet werden, um das klonogene Potential von Zellen qualitativ und quantitativ in vitro zu erfassen.

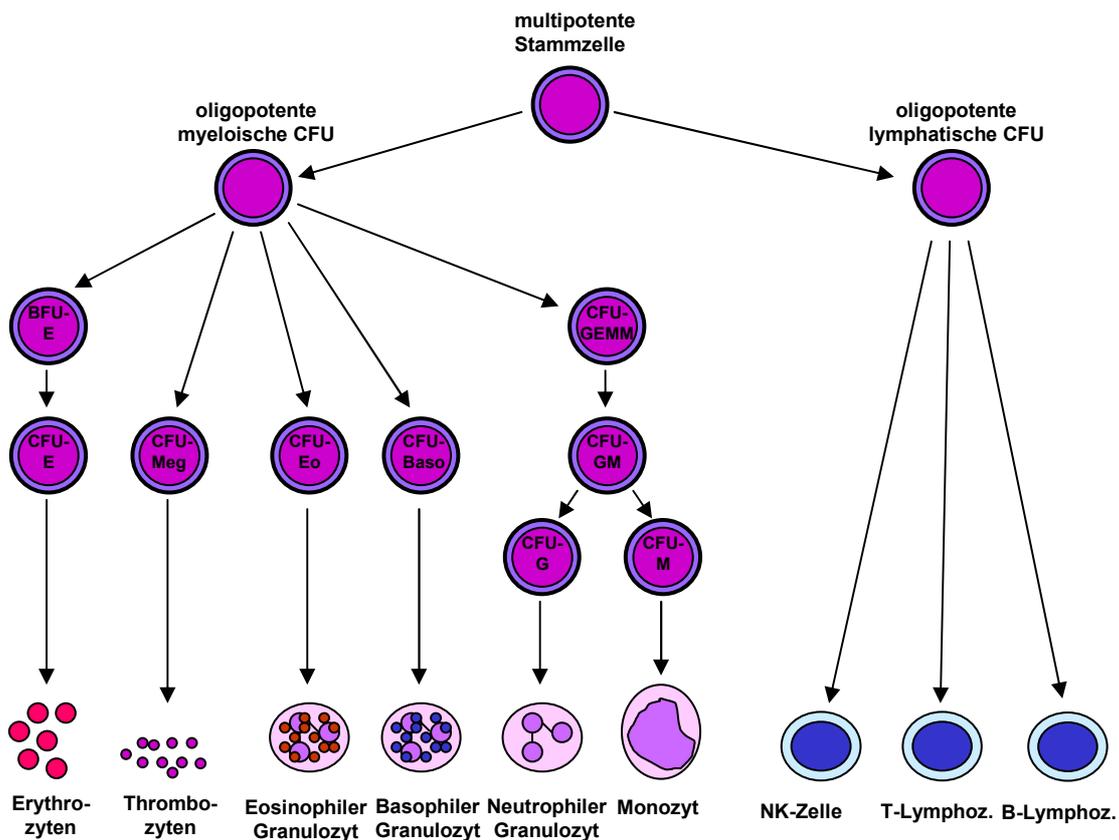


Abb. 3.2: Hierarchie hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen.

(CFU: colony forming unit, BFU: burst forming unit, E: erythrocyte, GEMM: granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte, Eo: eosinophile, Baso: basophile, GM: granulocyte monocyte, Meg: megakaryocyte, G: granulocyte, M: monocyte, NK-Zelle: natürliche Killerzelle, Lymphoz.: Lymphozyt)

3.2 Entwicklungsgeschichtliche Beziehung zwischen Hämatopoese und der Leber

Die Leber besitzt eine spezielle Beziehung zur Hämatopoese, da in der embryonalen und fetalen Entwicklung die Blutbildung auch im Parenchym der Leber stattfindet. [Hoyes et al. 1973]

Die Hämatopoese beginnt anfangs mit der Bildung von Blutinseln, die sich in der Embryonalphase bis zur sechsten Woche extraembryonal im Dottersack nachweisen lassen. Zunächst treten mesodermale Zellaggregate auf, deren äußere Zellen sich zu Endothel differenzieren, während sich die inneren Zellen zu primitiven Erythrozyten entwickeln, so dass mit Erythrozyten gefüllte Blutgefäße gebildet werden [Sabin 2002].

Erst später entstehen im Dottersack weitere primitive hämatopoetische Vorläuferzellen, die jedoch im Dottersack keine weitere Differenzierung durchlaufen. Im Gegensatz zur primitiven Hämatopoese im Dottersack beginnt die definitive Hämatopoese in der sog. AGM (Aorta, Gonaden, Mesonephros) -Region des sich entwickelnden Embryos durch Abknospung von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen von aortalen Endothelzellen. Diese Stammzellen, sowie die primitiven Vorläuferzellen des Dottersackes wandern dann in die Leber, um sich weiter zu differenzieren. Von der siebten bis zur 26ten Woche läuft die Blutbildung im Parenchym der Leber und ab der 20ten bis 32ten Woche außerdem in der Milz ab. Ab der 16ten Woche beginnt die Hämatopoese zusätzlich im Knochenmark [Thomas und Yoffey 1964].

3.3 Zelloberflächenmoleküle (Cluster of Differentiation)

Im humanen System sind derzeit über 300 verschiedene Zelloberflächenantigene bekannt. Diese werden seit 1981 im sog. Cluster of Differentiation (CD) -System erfasst und nach biochemischen oder funktionellen Kriterien geordnet. Dabei wird jedes Antigen einer speziellen CD-Nummer zugewiesen. Bei den CD-Molekülen handelt es sich in der Regel um membrangebundene Glykoproteine, die zum Teil zellspezifisch exprimiert werden und unterschiedliche Funktionen haben können. Die Analyse des Expressionsmusters von CD-Molekülen, die sog. Immunphänotypisierung stellt eine bedeutende Methode zur Charakterisierung von Zellen dar.

3.3.1 Stammzellantigene

CD34

CD34 ist ein glykosyliertes Typ-I Membranprotein, welches Anfang der 1980er Jahre auf der Zelloberfläche von humanen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen des Knochenmarkes entdeckt wurde [Civin et al. 1981]. Die Expression von CD34 ist abhängig von Differenzierungsgrad der Knochenmarkzellen [Krause et al. 1996]. Während ganz unreife Stammzellen nur schwach positiv für dieses Merkmal sind, weisen reifere Stammzellen eine starke Expression auf. Im Laufe der weiteren Differenzierung dieser Stammzellen kommt es dann zu einer kontinuierlichen

Herunterregulation der Expression. Ausdifferenzierte hämatopoetische Zellen sind CD34 negativ.

Im humanen System wird CD34 darüber hinaus von zirkulierenden Fibrozyten [Abe et al. 2001, Bucala et al. 1994], von Keratozyten des Auges [Thill et al. 2007], von intrahepatischen Progenitorzellen [Crosby et al. 2001] und von gastrointestinalen Stromatumoren exprimiert [Miettinen et al. 1995]. Die genaue Funktion des CD34-Antigens ist bisher nicht geklärt, es wird jedoch eine Rolle bei der Zelladhäsion, Zellmigration und Inhibierung der hämatopoetischen Differenzierung vermutet [Lange et al. 2007].

CD133

Bei dem Antigen CD133, früher als AC133 bekannt, handelt es sich um ein Membranprotein mit 5 transmembranen Domänen, welches 1997 erstmals im humanen System identifiziert wurde [Yin et al. 1997]. Dabei wurde gezeigt, dass CD133 auf einem Subset undeterminierter CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarkes, des Nabelschnurvenenblutes und der fetalen Leber exprimiert wird [Yin et al. 1997]. Initial wurde angenommen, dass das CD133 Antigen ausschließlich auf hämatopoetischen Stammzellen vorkommt. In einer assoziierten Studie wurde jedoch schon damals berichtet, dass das CD133 Transkript in Retina, Pankreas, Niere, Plazenta und schwach in Leber, Lunge, Gehirn und Herz nachweisbar ist [Miraglia et al. 1997].

Bereits im Jahre 2000 konnte gezeigt werden, dass CD133 als Oberflächenantigen auch auf humanen endothelialen Progenitorzellen exprimiert wird [Gehling et al. 2000, Peichev et al. 2000]. Humane Hämangioblasten weisen ebenfalls diesen Marker auf [Loges et al. 2004]. Inzwischen wurden CD133-positive (†) Stamm- und Progenitorzellen in zahlreichen gesunden Geweben identifiziert [Bussolati et al. 2005, Sawamoto et al. 2001, Schmelzer et al. 2007, Snippert et al. 2009]. Darüber hinaus wurden CD133⁺ Zellen ebenfalls aus verschiedenen epithelialen Tumoren isoliert und CD133 bis vor kurzem als Marker für Tumorstammzellen diskutiert [Mizrak et al. 2008]. Eine aktuelle Studie hat, neben weiteren, jedoch demonstriert, dass das CD133-Antigen im humanen System analog dem Prominin-1, dem homologen Protein im Maussystem, auch von differenzierten Epithelzellen exprimiert wird [Shmelkov et al. 2008, Weigmann et al. 1997]. Da nicht nur benigne, sondern auch maligne Epithelzellen CD133⁺ sind, ist CD133 als alleiniger Marker für Tumorstammzellen somit nicht ausreichend [Shmelkov et al. 2008].

Die Funktion des CD133-Antigens ist wie die des CD34-Antigens nicht abschließend geklärt. Der Molekülstruktur nach könnte es sich um einen Wachstumsfaktorrezeptor

handeln, ein Ligand wurde aber bisher noch nicht identifiziert. Durch die begrenzte Lokalisierung der CD133-Expression auf zytoplasmatischen Ausstülpungen wird über eine Rolle in der Organisation der Membran und/oder interzellulären Interaktionen postuliert [Corbeil et al. 2001, Yu et al. 2002].

CD117

CD117, auch bekannt unter der Bezeichnung c-kit, kommt im humanen System zum einen auf hämatopoetischen Stammzellen vor [André et al. 1989]. Ferner wird CD117 auf Endothelprogenitorzellen [Gehling et al. 2000, Peichev et al. 2000], auf intrahepatischen Progenitorzellen [Crosby et al. 2001, Kwon et al. 2002], auf Mastzellen [Nocka et al. 1990] und auf Tumorzellen in gastrointestinalen Stromatumoren exprimiert [Sarlomo-Rikala et al. 1998].

Funktionell handelt es sich bei CD117 um eine Rezeptor-Tyrosinkinase. Die Interaktion zwischen c-kit und seinem Liganden, dem Stem Cell Factor (SCF), ist am besten im hämatopoetischen System untersucht und spielt eine Schlüsselrolle für Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen [McNiece et al. 1991].

bcrp-1

Das breast cancer resistance protein (bcrp-1), auch als ATP binding cassette sub-family G member 2 (ABCG-2) bekannt, wird ebenfalls auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert [Bunting 2002, Kim et al. 2002]. Darüber hinaus findet es sich auf Stammzellen mit dem so genannten side population (SP) Phänotyp, die in zahlreichen nicht-hämatopoetischen Geweben vorkommen [Zhou et al. 2001] und auf embryonalen Stammzellen [Bunting 2002]. Es wird ferner auf der apikalen Membran von Syncytiotrophoblasten, Endothelzellen, Enterozyten und Hepatozyten exprimiert [Hardwick et al. 2007] und kann in zahlreichen soliden Tumoren nachgewiesen werden [Diestra et al. 2002].

Das bcrp-1 Protein funktioniert als Transmembranpumpe und gehört zur Gruppe der ATP binding cassette (ABC) Transporter. ABC Transporter benutzen Energie, die aus der Hydrolyse von ATP gewonnen wird, um diverse Substrate gegen einen Gradienten aus der Zelle zu schleusen. Die ABC Transporter gehören zu den multidrug resistance proteins. Diese Proteine besitzen die Eigenschaft zytotoxische Stoffe, wie sie beispielsweise in der Chemotherapie eingesetzt werden, aus der Zelle zu schleusen [Hyde et al. 1990, Sarkadi et al. 2006]. Somit kann die Wirkung einer Chemotherapie bei starker Expression von ABC-Transportern im Tumorgewebe stark herabgesetzt sein [Borst et al. 2000, Deeley et al. 2006].

3.3.2 Hämatopoetische Antigene

CD45

Das CD45 Antigen, initial auch leucocyte common antigen (LCA) genannt, ferner bekannt als protein tyrosin phosphatase receptor type C (PTPRC), ist auf allen kernhaltigen Zellen der Hämatopoese, d.h. auf allen humanen Leukozyten und unreifen Vorstufen von Erythrozyten und Thrombozyten vorhanden [Mason et al. 2001, Mason 2002]. Funktionell handelt sich um eine membranständige Protein-Tyrosinphosphatase, deren wesentliches Substrat zytosolische Kinasen der Src Familie sind. Eine wichtige Funktion besteht in der Aktivierung dieser Kinasen durch Dephosphorylierung eines inhibitorischen Phospho-Tyrosinrestes an deren C-terminalem Ende. Da Src-Kinasen entscheidend an der Initiierung der Signaltransduktion von T- und B-Zellantigenrezeptoren beteiligt sind, wird die Aktivierung dieser Rezeptoren begünstigt. Darüber hinaus reguliert CD45 via Aktivierung von Src- und Janus Kinasen zahlreiche Zellprozesse, einschließlich Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen [Holmes 2006, Irie-Sasaki et al. 2003].

CD14

Das CD14-Molekül kommt in zwei Formen vor: membrangebundenes CD14 (mCD14) und lösliches CD14 (sCD14). Auf sCD14, welches von Monozyten und Hepatozyten synthetisiert wird und im Serum nachweisbar ist [Bas et al. 2004', Durieux et al. 1994], soll hier nicht weiter eingegangen werden. mCD14 wird im humanen System vor allem auf Monozyten und Makrophagen exprimiert [Goyert und Ferrero 1987]. Etwa 80% der peripheren Blutmonozyten weisen eine starke Expression dieses Markers auf. Eine schwache mCD14-Expression findet sich ferner auf aktivierten Granulozyten [Goyert und Ferrero 1987], auf einer kleinen Subpopulation von B-Lymphozyten [Ziegler-Heitbrock et al. 1994] und auf dendritischen Zellen [Verhasselt et al. 1997]. Darüber hinaus kommt mCD14 auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen vor. So wird es auf Chondrozyten [Tobias und Ulevitch 1993], gingivalen Fibroblasten [Sugawara et al. 1998], Keratinozyten [Song et al. 2002], Endothelzellen der Nabelschnur [Jersmann et al. 2001] und Gliazellen des Gehirns [Ulvestad et al. 1994] exprimiert. In der humanen Leber ist mCD14 auf sinusoidalen Endothelzellen [Scoazec und Feldmann 1991] und Kupfferzellen [Dai et al. 2003, Tomita et al. 1994] nachweisbar.

Membranständiges CD14 fungiert als Rezeptor für Endotoxine in Form von Lipopolysacchariden (LPS), bei dem es sich um einen Bestandteil der äußeren Zellmembran von gram-negativen Bakterien handelt [Wright et al. 1990]. Für die Bindung von LPS an mCD14 entscheidend ist das LPS-bindende Protein LBP, welches

als Akut-Phase-Protein von Hepatozyten synthetisiert wird und mit LPS hochaffine Komplexe bildet [Tobias et al. 1989]. Durch die Bindung dieser LBP/LPS-Komplexe kommt es zu einer Aktivierung der toll-like Rezeptoren (TLR) 2 und 4 [Muta und Takeshige 2001] und zur Sekretion von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und weiterer Entzündungsmediatoren [Wright et al. 1990].

Membranständiges CD14 ist nicht nur der wichtigste Rezeptor für Endotoxine, sondern scheint darüber hinaus auch für die Bindung von Peptidoglykan, einem Zellmembranbestandteil gram-positiver Bakterien, verantwortlich zu sein [Gupta et al. 1996]. Im weiteren Verlauf wird CD14 für mCD14 verwendet.

CD184

CD184, besser bekannt als CXCR4, wurde 1994 erstmals auf humanen Leukozyten des peripheren Blutes identifiziert [Loetscher et al. 1994]. Inzwischen wurde die Expression von CXCR4 auf zahlreichen verschiedenen Zell- und Gewebstypen, einschließlich verschiedener Leukozytensubpopulationen, hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen sowie nicht-hämatopoetischer differenzierter Zellen nachgewiesen [Murdoch 2000]. Studien im Rattenmodell weisen darauf hin, dass auch intrahepatische Progenitorzellen CXCR4 exprimieren [Hatch et al. 2002]. Dabei wird diskutiert, dass es sich bei den CXCR4-positiven intrahepatischen Progenitorzellen um rekrutierte Zellen des Knochenmarkes handelt.

CD184 gehört zur Familie der 7-Transmembran Chemokin- Rezeptoren [Loetscher et al. 1994] und bindet spezifisch den Liganden stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) [Bleul, Farzan et al. 1996, Oberlin et al. 1996]. SDF-1 wird u.a. von Zellen des Knochenmarkes ausgeschüttet und spielt eine essentielle Rolle in der Anlockung von hämatopoetischen Progenitorzellen [Dutt et al. 1998, Kim und Broxmeyer 1998] sowie bei der Chemotaxis von anderen CXCR4-positiven Zellen [Bleul, Fuhlbrigge et al. 1996, Kucia et al. 2005].

3.4 Zelluläre Mechanismen der Leberregeneration

Die Leber hat sich während der evolutionären Entwicklung mit einer einzigartigen regenerativen Fähigkeit an einen Gewebsuntergang durch Zufluss von Toxinen oder Verletzungen angepasst und antwortet darauf mit einem schnellen Gewebsersatz [Michalopoulos und DeFrances 1997, Taub 2004]. Bei der Regeneration akuter und chronischer Schädigung scheinen verschiedene Zellkompartimente eine Rolle zu spielen. Zu diesen Zellkompartimenten zählen Hepatozyten [Fausto und Campbell

2003, Michalopoulos 2007], intrahepatische Progenitorzellen [Alison et al. 1997, Haruna et al. 1996, Nagy et al. 1994] und vermutlich auch Stammzellen aus dem Knochenmark [Petersen et al. 1999]. Darüber hinaus wurden in der humanen Leber Stammzellen entdeckt, die sich funktionell von intrahepatischen Progenitorzellen unterscheiden und deren Bedeutung für die Leberregeneration noch nicht geklärt ist [Schmelzer et al. 2007].

3.4.1 Regeneration durch Hepatozyten

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass die Regeneration der Leber in erster Linie über reife Hepatozyten vermittelt wird [Fausto und Campbell 2003]. In der Leber eines gesunden Erwachsenen befinden sich die Hepatozyten in einem ruhenden Stadium und teilen sich ein bis zweimal pro Jahr. Allerdings kann die Proliferationsrate stark ansteigen, z.B. nach einer Verletzung oder durch einen operativen Eingriff wie eine partielle Hepatektomie [Grisham 1962, Michalopoulos 1990]. So wurde bei Nagern eine vollständige Wiederherstellung der Leber nach einer 2/3 Leberresektion innerhalb von ein bis zwei Wochen nachgewiesen [Michalopoulos und DeFrances 1997]. Die extensive Proliferation der reifen Hepatozyten wird durch verschiedene Faktoren reguliert. Führender Stimulator zur Proliferation ist der Wachstumsfaktor hepatocyte growth factor (HGF). Dieser wird hauptsächlich produziert und sezerniert von Sternzellen/Itozellen der Leber [Schirmacher et al. 1993], und weiterhin von sinusoidalen Endothelzellen [LeCouter et al. 2003]. Umgekehrt werden sinusoidale Endothelzellen zur Proliferation angeregt durch Wachstumsfaktoren, die produziert werden von Hepatozyten. Dabei handelt es sich u.a. um den vascular endothelial growth factor (VEGF) und den transforming growth factor alpha (TGF- α) [Mead und Fausto 1989, Michalopoulos 2007]. Letzterer kann zusätzlich Cholangiozyten zur Proliferation stimulieren [Michalopoulos 2007]. Der tumor necrosis factor alpha (TNF- α) spielt eine weitere, wenn auch untergeordnete Rolle, bei der Regulation der Proliferation von Hepatozyten [Michalopoulos 2007]. TNF- α wird innerhalb der Leber von Kupfferzellen produziert [Michalopoulos 2007] und extrahepatisch von zirkulierenden Monozyten synthetisiert [Wright et al. 1990].

3.4.2 Regeneration durch intrahepatische Progenitorzellen

Die Rolle von intrahepatischen Progenitorzellen bei der Leberregeneration wurde jahrzehntelang kontrovers diskutiert. Zahlreiche Studien sprechen jedoch dafür, dass es in Situationen, in denen die Proliferation der Hepatozyten beeinträchtigt ist oder eine ausgedehnte und/oder chronische Leberschädigung besteht, zu einer Aktivierung und Proliferation von intrahepatischen Progenitorzellen kommt [Evarts et al. 1993, Fujio et al. 1994, Sell 1994]. In einer Studie an Ratten wurde gezeigt, dass nach einer Blockierung der Mitose der Hepatozyten durch DNA-Alkylantien, kombiniert mit einer Leberresektion, diese Progenitorzellen in Form von Proliferation entlang der intralobären Gallengänge in Erscheinung treten [Alison et al. 1997]. Diese Zellen, im Nagerrmodell Ovalzellen genannt, zeigen phänotypische Eigenschaften sowohl von adulten Hepatozyten wie auch von Gallengangsepithelzellen und werden als bipotente Progenitoren angesehen, die zu Hepatozyten [Evarts et al. 1987] und Cholangiozyten differenzieren können [Rountree et al. 2007]. Phänotypisch weisen Ovalzellen ferner ein ähnliches Expressionsmuster wie hämatopoetische Stammzellen (u.a. CD34, c-kit, bcrp-1, CD45) und fetale Hepatoblasten (Bildung von alpha Fetoprotein, AFP) auf [Cantz et al. 2008, Petersen et al. 1999, Shimano et al. 2003]. Die Feststellung, dass Ovalzellen auch hämatopoetische Stammzellgene exprimieren, hat zu der Hypothese geführt, dass sie sich von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) des Knochenmarkes herleiten. Diese Hypothese konnte jedoch nur in einer Studie an Mäusen bestätigt werden [Petersen et al. 1999]. Andere Studien an Nagern sprechen eher dafür, dass es sich bei Ovalzellen um in der Leber residente Progenitorzellen handelt [Menthen et al. 2004, Wang, Foster et al. 2003]. Das humane Äquivalent der Ovalzellen wurde 1990 von Roskams et al. als "ductular reactions" beschrieben. "Ductular reactions" sind ebenfalls als Zellproliferate entlang der intrahepatischen Gallengänge einer erkrankten humanen Leber nachweisbar. Morphologie und phänotypische Eigenschaften entsprechen denen muriner Ovalzellen [Demetris et al. 1996, Kiss et al. 2001, Roskams et al. 1990, Roskams et al. 1998]. Diese "ductular reactions" mit Ovalzell-ähnlicher Erscheinung wurden im humanen Lebergewebe bei verschiedenen Erkrankungen entdeckt. Diese "humanen Ovalzellen" wurden unter anderem im Hepatitis B assoziiertem HCC detektiert [Hsia et al. 1992], im Hepatoblastom [Ruck et al. 1997], bei cholestatischen Lebererkrankungen wie der primär biliären Zirrhose und der primär sklerosierenden Cholangitis [Crosby et al. 1998] und bei Steatosis hepatis nachgewiesen [Roskams et al. 2003]. Die Herkunft bzw. Herleitung dieser "ductular reactions" ist derzeit nicht bekannt. Es kann vermutet werden, dass es sich um rekrutierte Stamm- und Progenitorzellen aus dem Knochenmark handelt [Crosby et al.

2001, Housset 2000, Lemmer et al. 1998, Wu und Yu 2007]. Alternativ kann eine Präexistenz von hepatischen Progenitorzellen in der Umgebung der Gallengänge postuliert werden [Roskams et al. 2004].

3.4.3 Regeneration durch intrahepatische Stammzellen

Zusätzlich zu den intrahepatischen Progenitoren, als “ductular reactions“ oder “humane Ovalzellen“ bezeichnet, gibt es Vermutungen über die Beteiligung von intrahepatischen Stammzellen bei der Regeneration der Leber [Herrera et al. 2006, Khuu et al. 2007, Schmelzer et al. 2007]. Diese intrahepatischen Stammzellen zeigen andere Eigenschaften als “humane Ovalzellen“. Kürzlich wurden diese intrahepatischen Stammzellen als mögliche pluripotente Vorläuferzellen von Hepatoblasten beschrieben [Schmelzer et al. 2007]. Hepatoblasten sind Progenitorzellen, die während der fetalen Entwicklung der Leber zu Hepatozyten und Cholangiozyten ausdifferenzieren [Haruna et al. 1996, Kubota und Reid 2000]. In der Studie von Schmelzer et al. wurden diese Zellen nach Herkunft und Fähigkeiten untersucht: Sie waren lokalisiert in den Duktalplatten in der fetalen Leber, aber auch in den Hering Kanälen der adulten Leber. Überleben und Proliferation dieser vermeintlichen Stammzellen der Leber erforderte parakrine Signale von hepatischen Sternzellen und/ oder Angioblasten. Sie exprimierten unter anderem Zytokeratine und CD133. Sie waren negativ für Marker, die für adulte Hepatozyten charakteristisch sind, wie AFP und Cytochrom P450. Sie zeigten keine Expression von Markern für hämatopoetische Stammzellen (CD45-negativ), und Mesenchymalzellen (VEGF-, Desmin-negativ). Die Transplantation dieser Zellen in SCID Mäusen führte zur Bildung von ausgereiften Lebergewebe mit Expression von human-spezifischen Proteinen wie Albumin und AFP [Schmelzer et al. 2007].

Ein Jahr zuvor wurde bereits von einer Zellpopulation in der Leber des Menschen berichtet, die sich ebenfalls phänotypisch von “humanen Ovalzellen“ unterscheidet [Herrera et al. 2006]. Diese Zellpopulation exprimierte mesenchymale Stammzellmarker, aber keine hämatopoetischen Stammzellmarker, wie CD45, CD117, CD34 oder CD133. Sie differenzierten in vitro zu reifen Hepatozyten durch HGF und exprimierten Cytochrom p450 und Albumin. In Vivo trugen sie zur Regeneration von Leberparenchym von SCID Mäusen bei [Herrera et al. 2006]. Eine ähnliche Entdeckung machte die Forschergruppe von Khuu et al. Sie beschrieben Epithelzellen aus gesunder humaner Leber, die unter Kulturbedingungen hepatozytäre Proteine wie

Albumin, und biliäre Marker bildeten. Phänotypisch waren sie negativ für Marker, die für adulte Hepatozyten und für Ovalzellen charakteristisch sind. Die Transplantation dieser Zellen in SCID Mäusen führte zum Nachweis Albumin-positiver Zellhaufen in dem transplantierten Gewebe. [Khuu et al. 2007]

3.4.4 Regeneration durch Stammzellen aus dem Knochenmark

Zahlreiche Studien der vergangenen Jahre weisen daraufhin, dass zusätzlich zu reifen Hepatozyten und intrahepatischen Progenitoren auch Stammzellen des Knochenmarkes an der Leberregeneration beteiligt sind. Es wird postuliert, dass das Knochenmark heterogene Populationen von Stamm- und Progenitorzellen beherbergt. So suggerierten mehrere Studien in den letzten Jahren, dass Knochenmarkzellen zu Muskel- [Ferrari et al. 1998], Herz- [Orlic et al. 2001], ZNS- [Eglitis und Mezey 1997] und Lebergewebe [Alison et al. 2000, Lagasse et al. 2000, Theise et al. 2000, Wang und Ge et al. 2003] differenzieren können. Etwa zeitgleich wurden Transplantationsstudien durchgeführt, die darauf hinweisen, dass transplantierte Stammzellen aus dem Knochenmark in die Leber eindringen können und in der Lage sind, Hepatozyten und Cholangiozyten zu entwickeln [Alison et al. 2000, Lagasse et al. 2000, Petersen et al. 1999, Theise et al. 2000, Wang und Ge et al. 2003]. Beispielsweise konnte Theise et al. in Leberbiopsien sämtlicher Patientinnen, denen gegengeschlechtliches Knochenmark transplantiert worden war, Y-Chromosom-positive Hepatozyten und Cholangiozyten nachweisen [Theise et al. 2000].

Da die Leber während der pränatalen Entwicklung als ein Ort der Hämatopoese fungiert, wird vermutet, dass adulte hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarkes die Fähigkeit besitzen, zu Leberparenchymzellen zu "transdifferenzieren". Erste Berichte über die Plastizität, d.h. das Potential zur Multiorgan-Differenzierung von HSZ wurden in den späten 1990er Jahren publiziert. Adulte CD34 positive HSZ schienen in vitro auf Einzelzellebene die Fähigkeit zu besitzen, sich zu Epithelzellen von Leber, Lunge, Gastrointestinaltrakt und Haut zu differenzieren [Krause et al. 2001]. Im selben Zeitraum beschrieb Lagasse et al., dass HSZ zu funktionsfähigen Leberzellen differenzieren können. In dieser Studie wurden aufgereinigte HSZ gesunder Mäuse Fumarylacetoacetathydrolase defizienten (FAH^{-/-}) Mäusen intravenös injiziert. Die Transplantation der gesunden HSZ resultierte im Überleben dieser letal an Tyrosinämie Typ I erkrankten Mäusen, indem die biochemische Funktion der Leber wiederhergestellt wurde [Lagasse et al. 2000]. In

einer späteren Studie wurde immundefizienten Mäusen CD34-positive HSZ aus humanem Knochenmark oder Nabelschnurblut transplantiert. Einen Monat später wurde bei diesen Mäusen mittels Tetrachlormethan (CCl₄) eine akute toxische Leberzellschädigung induziert. Als Kontrollgruppen dienten Mäuse die nur CCl₄ oder HSZ erhielten. Zur Evaluierung des hepatozytären Differenzierungspotentials der HSZ wurde die Expression von humanem Albumin in der Leber und im Serum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nur in denjenigen Mäusen funktionell intakte Hepatozyten ausdifferenzieren, in welchen eine Leberschädigung induziert wurde und humane HSZ transplantiert wurden [Wang und Ge et al. 2003].

Zeitgleich wurde jedoch von Kanazawa et al. demonstriert, dass KM Zellen nur geringfügig an der Leberregeneration beteiligt sind. In dieser Studie wurde das hepatozytäre Differenzierungsvermögen markierter KM-Zellen unter verschiedenen Arten der Leberschädigung im Mausmodell untersucht. Die erste Gruppe umfasste Mäuse mit CCl₄ induziertem akuten toxischen Leberschaden. Die zweite Gruppe bildeten Mäuse, die transgen Albumin-Urokinase überexprimierten und nachfolgend ein subakutes Leberversagen entwickelten. Die dritte Gruppe von Mäusen wurden mit dem Hepatitis B- Virus infiziert, und stand repräsentativ für eine chronische Schädigung. Bei allen drei Gruppen war in der Leber nur eine geringe Anzahl von Hepatozyten nachweisbar, die aus markierten KM Zellen abstammten [Kanazawa und Verma 2003]. Auch andere Studien sind zu dieser Einschätzung gekommen. Derzeit variieren die Raten bezüglich der Beteiligung von KM Zellen an der Leberrepopulation zwischen <0,01% bis zu 40% [Alison et al. 2000, Kanazawa und Verma 2003, Körbling et al. 2002, Lagasse et al. 2000, Petersen et al. 1999, Theise et al. 2000, Wang und Ge et al. 2003].

Viele dieser Studien wurden inzwischen in Frage gestellt, durch weitere Untersuchungen, die demonstrieren haben, dass nicht eine Transdifferenzierung sondern eine Zellfusion das zugrunde liegende Prinzip einer nicht hämatopoetischen Determinierung von HSZ ist [Alvarez-Dolado et al. 2003, Camargo et al. 2004, Nygren et al. 2004, Vassilopoulos et al. 2003, Wang und Willenbring et al. 2003, Willenbring et al. 2004]. Im normalen Organismus findet Zellfusion während der Embryogenese statt und ist ein zentraler Mechanismus der Differenzierung von Trophoblasten, adultem Muskel- und Knorpelgewebe [reviewed in Larsson et al. 2008]. Initiale Studien des Zellfusionspotential in vitro weisen darauf hin, dass sowohl adulte humane neuronale Stammzellen als auch Knochenmarksstammzellen mit embryonalen Stammzellen fusionieren können [Terada et al. 2002]. Darüber hinaus wurde im FAH^{-/-} Mausmodell zum einen gezeigt, dass HSZ mit Hepatozyten fusionieren und somit die Funktion Enzym-defizienter Hepatozyten wiederherstellen können [Vassilopoulos et al. 2003,

Weitere Studien weisen daraufhin, dass Knochenmarkszellen eine wichtige Rolle sowohl bei der Entstehung als auch bei der Regeneration fibrotischer Lebererkrankungen spielen und zur Wiederherstellung von chronisch geschädigtem Lebergewebe beitragen. Forbes et al. untersuchte den Anteil KM-hergeleiteter Zellen in fibrotischen Arealen der Leber eines Patienten, der eine KM-Transplantation erhalten hatte. Es konnte demonstriert werden, dass ein signifikanter Anteil hepatischer Myofibroblasten dem KM entstammten [Forbes et al. 2004]. Demgegenüber sprechen andere Studien in Nagern dafür, dass eine KM-Transplantation bei bestehender chronischer Lebererkrankung die Leberregeneration stimulieren und durch Verringerung der hepatischen Fibrose die Leberfunktion verbessern kann [Sakaida et al. 2004, Ueno et al. 2006]. In einer Studie von Duffield et al. wurde gezeigt, dass monozytäre/makrophagozytäre Zellen des KM sowohl zur Entstehung als auch zur Verringerung der Fibrose während einer entzündlichen Lebererkrankung beitragen können [Duffield et al. 2005].

Zusammenfassend weisen zahlreiche Studien darauf hin, dass KM Zellen an der Regeneration akuter und chronischer Leberschädigungen beteiligt sein könnten.

Bis vor kurzem wurde postuliert, dass die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie bzw. Leberresektion ausschließlich über proliferierende Hepatozyten vermittelt wird [Fausto et al 2003; Michalopoulos 2007]. Dabei beruht dieses Postulat allerdings auf Ergebnissen tierexperimenteller Studien, die nicht notwendigerweise auf das humane System übertragbar sind. Denn im Gegensatz zu dieser Annahme wurde im Nagermodell in einer Studie von Fujii et al. gezeigt, dass es im Anschluss an eine partielle Hepatektomie zu einer Einwanderung von KM-Zellen in die Leber kommt, wo sie sich an der Regeneration beteiligen [Fujii et al. 2002]. Dies war die erste Studie, die eine direkte Involvierung der KM Zellen bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zeigte. Diese Beobachtungen wurden unterstützt von einer Studie von Gehling et al., die den Anteil zirkulierender Stamm- und Progenitorzellen im peripheren Blut gesunder Leberlebendspender untersuchte [Gehling et al. 2005]. Es konnte gezeigt werden, dass eine partielle Hepatektomie die Mobilisierung hämatopoetischer Progenitorzellen induziert. Die mobilisierten Progenitorzellen wiesen einen universellen, CD133-positiven und myelomonozytären Phänotyp und hämatopoetisches als auch hepatozytäres Differenzierungspotential in vitro auf. Die Autoren analysierten vergleichend periphere Blutproben von Patienten, die sich aufgrund einer gynäkologischen bzw. traumatologischen Indikation einer Operation unterziehen mussten. Es fand sich keine Mobilisierung von Stamm- und Progenitorzellen bei diesen Patienten. Die Autoren schlussfolgern somit, dass die

durch eine partielle Hepatektomie mobilisierten myelomonozytären Progenitorzellen eine Rolle bei der Leberegeneration spielen könnten.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchsplanung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es im Anschluss an eine Pfortaderembolisation sowie nach Leberresektion zur Freisetzung von Stamm- und Progenitorzellen in das periphere Blut kommt und wie diese Stammzellen phänotypisch und funktionell charakterisiert sind. Hierzu sollten Blutproben von Patienten, die sich einer Pfortaderembolisation oder einer Leberteileresektion unterziehen mussten, prä- und postoperativ untersucht werden. Vergleichend sollten prä- und postoperative Blutproben von Leberlebend Spendern analysiert werden. Die Proben sollten zunächst mittels Durchflusszytometrie phänotypisch analysiert werden und weiterhin in einem standardisierten Kultursystem (Colony Assay) eingebracht werden, um die Differenzierungspotentiale dieser Zellen zu erfassen.

4.2 Klinische Daten der Versuchspersonen

Die Stichprobe setzte sich zunächst aus drei verschiedenen Kollektiven zusammen. Leider wurden kurz nach Aufnahme dieser Arbeit keine Pfortaderembolisationen mehr in unserer Klinik durchgeführt. Es konnten nicht genügend Daten für eine aussagefähige Auswertung erfasst werden. Daher wird im Folgenden auf die Angabe dieses Kollektivs verzichtet.

Die weiteren Angaben beziehen sich auf zwei Kollektive: Kollektiv I besteht aus Patienten, die sich einer Leberresektion unterziehen mussten. Kollektiv II umfasst gesunde Leberspender. Die ausgewerteten Daten stammen aus diesen beiden Kollektiven mit folgenden Eigenschaften.

Kollektiv I 11 Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen

(Patient Nr. 1 bis 11)

Alter: 60 Jahre (MW, SEM \pm 4,8)

Geschlecht: 6 weiblich, 5 männlich

Kollektiv I umfasst Patienten mit malignen sowie benignen Lebererkrankungen (Tabelle 4.1). Das Ausmaß der Leberresektion variierte innerhalb dieser Gruppe sehr. Es wurden sowohl einzelne als auch mehrere Lebersegmente reseziert, eine Hemihepatektomie links sowie rechts und eine erweiterte Hemihepatektomie rechts durchgeführt (Tabelle 4.2). Bei vier Patienten wurde zusätzlich die Gallenblase entfernt. Nach dem operativen Eingriff wurde ein Patient mit Erythrozyten-, Thrombozytenkonzentraten und Fresh Frozen Plasma substituiert. Der postoperative Verlauf aller anderen Patienten des Kollektiv I zeigte sich komplikationslos. An Begleiterkrankungen wurde bei drei Patienten eine koronare Herzkrankheit festgestellt, bei drei weiteren Patienten eine Leberzirrhose, bei einem Patienten Diabetes mellitus Typ I, bei drei Patienten Diabetes mellitus Typ II und ein Patient befand sich im Zustand nach einer Chemotherapie. Bei allen Patienten wurde der Tumor bzw. wurden die Metastasen als R0 oder R1 Resektion entfernt.

Tabelle 4.1: Hauptdiagnosen der Patienten des Kollektiv I (dargestellt mit entsprechender Anzahl der Patienten).

Hauptdiagnosen	Patientenanzahl
maligne: cholangiozelluläres Karzinom	3
hepatozelluläres Karzinom	2
solitäre Metastase eines Kolonkarzinoms	2
multiple Metastasen eines Kolonkarzinoms	2
benigne: hepatozelluläres Adenom	1
multiple Leberzysten	1

Kollektiv II 5 Leberlebendspender (Spender 1 bis 5)Alter: 39,4 Jahre (MW, SEM \pm 3,7)

Geschlecht: 2 weiblich, 3 männlich

Das Kollektiv II besteht aus gesunden Leberspendern. Das Ausmaß der Operation war in diesem Kollektiv unterschiedlich. Bei drei Spendern wurden zwei Segmente reseziert, und bei jeweils einem Spender wurde eine Hemihepatektomie links bzw. rechts durchgeführt (Tabelle 4.2). Der operative Eingriff und der postoperative Verlauf zeigten sich komplikationslos.

Tabelle 4.2: Überblick über Art und Umfang der durchgeführten Leberresektionen im Kollektiv I und II (mit entsprechender Anzahl der Patienten/ Spender).

Kollektiv	Ausmaß der Resektion	Patienten-/Spenderanzahl
I	Segment V	2
	Segment VI	2
	Segment V und VI	1
	Segmente I bis IV	1
	Segmente IV bis VIII	1
	Segmente VI und VII	1
	Segmente VII und VIII	1
	Segmente II und Teile von IV bis VII	1
	Segmente V bis VIII	1
II	Segmente II und III	3
	Segmente I bis IV	1
	Segmente V bis VIII	1

4.3 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie ermöglicht das Zählen von Partikeln wie Zellen oder Kunststoffkügelchen sowie die Analysen ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften in einem Flüssigkeitsstrom. Ein Durchflusszytometer benötigt eine Kombination aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und der dazugehörigen Elektronik. Das Flüssigkeitssystem dient dem Transport und der Fokussierung der Zellen im Messpunkt. Das optische System kann durch einen Lichtstrahl (Laser) simultan mehrere Eigenschaften wie Größe und Granularität kompletter Zellen mit hoher Durchsatzrate messen. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Durch Erzeugung einer hydrodynamischen Fokussierung aufgrund der Querschnittsverringering der Messküvette im Bereich des Laserstrahls können die Zellen den Laserstrahl jeweils einzeln passieren und damit als einzelne Zelle gemessen werden (Abbildung 4.1). Eine den Laserstrahl kreuzende Zelle verursacht Streulicht in verschiedene Richtungen. Das Vorwärtstreulicht (FSC: Forward Scatter) wird entlang der Achse des einfallenden Lichts gemessen und ist proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht (SSC: Side Scatter) wird in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen und ist proportional zur Zellgranularität (Abbildung 4.1).

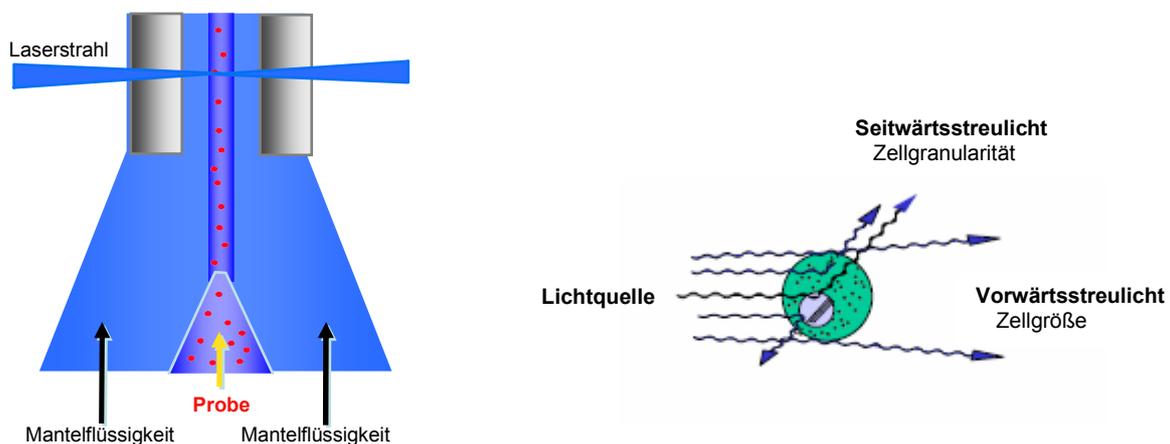


Abb. 4.1: Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung (links) und Veranschaulichung der Streulichterzeugung (rechts). (Abbildung genehmigt von Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D; siehe Anhang)

Weiterhin ist es durchflusszytometrisch möglich, Zelloberflächenmoleküle zu charakterisieren, nachdem die zu analysierenden Zellen mit Fluorochrom-konjugierten

Antikörpern inkubiert wurden. Hat eine Zelle einen Fluorochrom-konjugierten Antikörper gebunden und passiert den Laser, so absorbiert das Fluorochrom die Energie des Laserlichts und gibt diese Energie hauptsächlich als Emission wieder ab. Die emittierten Lichtsignale werden zu spezifischen Detektoren geleitet, in ein elektronisches Signal umgewandelt und an die angeschlossene Computereinheit weiter geleitet. Analoge Signale werden von der Elektronik in proportional digitale Signale umgewandelt.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen als zweidimensionale Punktwolkengraphik (Dot Plot). Bei diesem Dot Plot können Zellgröße und -granularität als Parameter gegeneinander aufgetragen werden. Bei der Analyse von peripherem Blut erscheinen die Leukozyten entsprechend ihrer Größe und Granularität in „Zellwolken“. Dabei sind drei Zellpopulationen eindeutig abgrenzbar: Die Granulozyten (relativ große Zellen mit zahlreichen Granula), die Monozyten (relativ große Zellen mit wenig Granula) und die Lymphozyten (relativ kleine Zellen ohne Granula). Zur weiteren Analyse der Expression von Antigenen werden die Zellen wie oben angegeben mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern inkubiert. Hierbei können mehrere Antikörper, die mit verschiedenen Fluorochromen konjugiert sind, gleichzeitig eingesetzt werden. Dies ermöglicht die Analyse von Koexpressionen mehrerer Antigene (Abbildung 4.2).

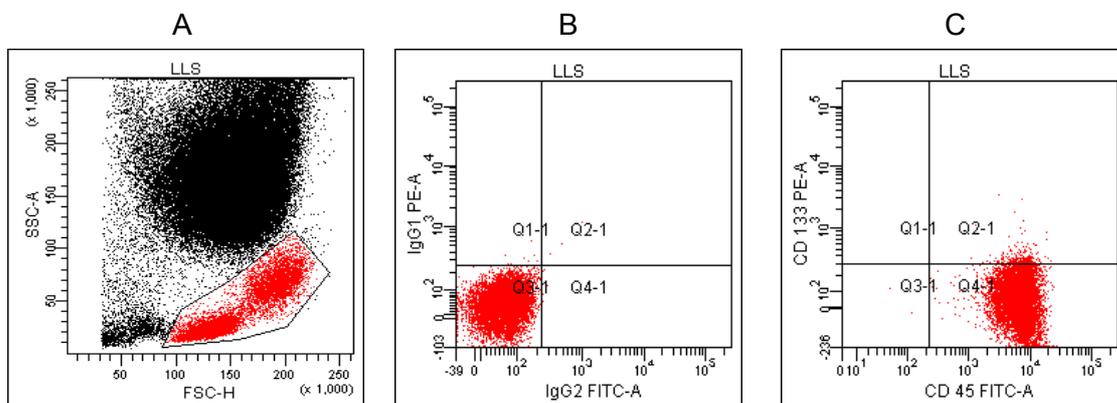


Abb. 4.2: Beispiel einer durchflusszytometrischen Analyse, dargestellt als Dot Plot. Unter A lassen sich die Granulozyten als große schwarze Wolke von den Monozyten (rechte rote Wolke) und Lymphozyten (linke rote Wolke) deutlich abgrenzen. B zeigt eine Isotypkontrolle ohne unspezifische Bindung, d.h. nahezu alle Zellen bilden sich im Quadrant Q3-1 ab. In C ist die Mehrzahl der Zellen einfach positiv für den Marker CD45 (in Quadrant Q4-1), wenige sind doppelt positiv für die Marker CD133 und CD45 (in Quadrant Q2-1), und keine der Zellen zeigt sich einzeln positiv für den Marker CD133 (in Quadrant Q1-1).

(LLS: Leberlebenspender, SSC: side scatter, FSC: forward scatter, PE: Phycoerythrin, FITC: Fluorescein Isothiocyanat, Q: Quadrant)

4.3.1 Versuchsordnung

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden periphere Blutproben der Patienten des Kollektiv I (Patient Nr. 1 bis 11) und II (Spender Nr. 1 bis 5) verwendet. Angereicherte Blutleukozyten wurden mittels Zweifarbendurchflusszytometrie im Hinblick auf die Expression der Stammzellmarker CD133, CD34, c-kit und bcrp-1, des Endothel- und Monozytenmarkers CD14 sowie des Panleukozytenmarkers CD45 und des SDF-1 Rezeptors CXCR4 analysiert und quantifiziert. Hierbei wurden Phycoerythrin- (PE) und Fluorescein Isothiocyanat- (FITC) konjugierte, monoklonale Antikörper (MoAb) verwendet. Als Kontrollantikörper wurden PE- und FITC-markierte Immunglobulin-Isotypantikörper (IgG₁, IgG₂) eingesetzt. Aus jeder Blutprobe wurden elf Analyseröhrchen (Tubes) angefertigt (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Kombinationen der Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen.

Tube Nummer	Immunglobuline - PE markiert	Immunglobuline - FITC markiert
	MoAb - PE markiert	MoAb - FITC markiert
1	γ1 (IgG ₁)	γ1 (IgG ₁)
2	γ1 (IgG ₁)	γ2 (IgG ₂)
3	CD133	CD45
4	CD133	CD14
5	CD133	CD34
6	CD45	CD34
7	c-kit	CD34
8	bcrp-1	CD34
9	CD133	CXCR4
10	c-kit	CXCR4
11	bcrp-1	CXCR4

4.3.2 Gewinnung und Vorbereitung der Blutproben

Bei beiden Kollektiven wurde jeweils eine Blutprobe von 10ml präoperativ (in der Regel ein Tag prä OP) entnommen. In Kollektiv II erfolgten weitere Blutentnahmen 12h, 24h und am zweiten und dritten postoperativen Tag, während im Kollektiv I die postoperativen Blutentnahmen 12h, 24h und vom 2. bis 6. Tag durchgeführt wurden. Alle Blutproben wurden mittels heparinierter Röhrchen gewonnen und umfassten postoperativ 10-30ml.

Für die durchflusszytometrischen Analysen war es zunächst erforderlich, die Erythrozyten zu lysieren. Dafür wurde je 100µl heparinisiertes Blut in je 3ml Erythrozytenlysepuffer für 10min. inkubiert und bei 1500rpm 5min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit den lysierten Erythrozyten dekantiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um eine hohe Reinheit der Leukozyten zu erhalten. Anschließend wurde mit phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen.

Die gereinigten Leukozyten wurden als nächstes mit 10µl Blocking-Reagenz inkubiert, danach wurden je 10µl eines PE-konjugierten MoAb (bzw. Immunglobulin-Isotyps) und FITC-konjugierten MoAb (bzw. Immunglobulin-Isotyps) einpipetiert (Tabelle 4.3), gut gemischt und für 30min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen und in 350µl PBS resuspendiert.

4.3.3 Messung der Blutproben am FACS Gerät

Für die durchflusszytometrische Analyse der Blutleukozyten wurde ein FACS Canto Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Zunächst wurde eine Kompensation der verwendeten Fluorochrome durchgeführt, die auch die Autofluoreszenz der zu analysierenden Zellen mitberücksichtigte. Dann erfolgte die Messung der elf vorbereiteten Analyseröhrchen. Hierbei wurden 100.000 Ereignisse pro Probe mit einer Geschwindigkeit von 3000 Ereignissen/sec. gemessen. Die Ergebnisse der analysierten Zellen wurden in Form von Dot Plots dargestellt.

Die prozentuale Anzahl der für einen Marker positiven Zellen (Z), wie im Ergebnisteil und Anhang dargestellt, wurde wie folgt ermittelt:

$Z = \text{Anzahl der für PE- oder FITC-Fluorochrom-konjugierten MoAb positiven Zellen} - \text{Anzahl der für PE- oder FITC-Fluorochrom-konjugierten Isotyp Kontrolle positiven Zellen.}$

4.4 Analyse von hämatopoetischen und endothelialen Kolonien (Colony Assays)

Ein Colony Assay kann sowohl zur Bestimmung des Differenzierungsgrades als auch des Differenzierungspotentials von Stamm- und Progenitorzellen dienen. Dabei werden die zu analysierenden Zellpopulationen in ein semisolid Medium (z.B. Agar oder Methylzellulose) aufgenommen. Dieses semisolid Medium reduziert die Zellmigration und begünstigt, dass sich einzelne Zellen zu Zellklonen entwickeln, welche als einzelne Kolonien identifiziert werden können. Die Kolonien sind somit Nachkommen einer einzelnen Zelle. Wird die Methylzellulose mit bestimmten Wachstumsfaktoren angereichert, kann die Differenzierung in bestimmte Zellreihen induziert werden. Die Entwicklung von Kolonien differenzierterer hämatopoetischer oder endothelialer Progenitorzellen kann durch Faktoren wie SCF, IL-3, IL-6, G-CSF, und EPO (hämatopoetisch) und durch die Kombination von VEGF plus Stammzellwachstumsfaktor (stem cell growth factor: SCGF) stimuliert werden.

In einem hämatopoetischen Kolonie Ansatz wird die Generierung von BFU-E, CFU-E, CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-M und CFU-G beurteilt. Zellen dieser Kolonien gehören der myeloischen Reihe an. BFU-E und CFU-GEMM werden aus multipotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet, während CFU-E aus erythrozytär-determinierten Progenitoren hervorgehen. Entsprechend leiten sich CFU-GM von granulozytär/monozytär determinierten Progenitorzellen her. CFU-GM können CFU-G und CFU-M generieren, bei denen es sich um weiter differenzierte Progenitorzellen handelt. CFU-E können ausschließlich nur zu Erythrozyten, CFU-G zu Granulozyten und CFU-M zu Monozyten differenzieren (Abbildung 2.2, Kapitel 2.1.1). Weiterhin kann gelegentlich im hämatopoetischen Ansatz das Wachstum CFU-EC ähnlicher (endothelial cell like) Kolonien beobachtet werden, die eine ähnliche räumliche Anordnung wie die typischen CFU-EC des endothelialen Colony Assays aufweisen. Die typischen CFU-EC des endothelialen Colony Assays werden von kleinen runden Zellen gebildet, die sich wenig dicht und unterhalb der Methylzellulose auf zahlreichen Ebenen verteilen. Demgegenüber entwickeln sich hämatopoetische Kolonien in einer einzigen Ebene. Weiterhin können im endothelialen Ansatz atypische CFU-EC und CFU-M ähnliche (monocyte like) Kolonien unterschieden werden. CFU-M-like Kolonien sind morphologisch mit CFU-M Kolonien, wie sie im hämatopoetischen Colony Assay in Erscheinung treten vergleichbar, während es sich bei atypischen CFU-EC um Kolonien handelt, die anderen Kategorien nicht zugeordnet werden können.

4.4.1 Versuchsordnung

Für die Analyse des koloniebildenden Potentials wurden Blutproben von Patienten des Kollektiv I (Patient Nr. 7 bis 11) und Spendern des Kollektiv II (Spender Nr. 1 bis 5) verwendet, die präoperativ sowie 12 Stunden postoperativ gewonnen wurden. Für jede Blutprobe wurden pro hämatopoetischen und endothelialen Colony Assay jeweils zwei Petrischalen angelegt.

4.4.2 Vorbereitung der Kolonie Ansätze

Zunächst wurde das Verfahren der Erythrozytenlyse wie unter 4.3.2 beschrieben angewendet. Dabei wurde jeweils 10ml peripheres heparinisiertes Blut mit 40ml Erythrozytenlysepuffer inkubiert. Um die auf diese Weise gewonnenen Leukozyten in einer definierten Zelldichte einsetzen zu können, wurden 10µl der Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer am Lichtmikroskop gezählt (siehe Formel). Anschließend wurden jeweils 5×10^4 Zellen in 1ml Nährmedium aufgenommen und pro Colony Assay zwei Petrischalen mit jeweils 1ml zellhaltigem Medium angelegt. Für den hämatopoetischen Colony Assay wurde als Nährmedium Methylzellulose verwendet, die bereits mit verschiedenen rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren supplementiert war. Für den endothelialen Colony Assay musste native Methylzellulose zunächst mit den rekombinanten humanen Wachstumsfaktoren VEGF und SCGF supplementiert werden. Die Assays wurden für 14 Tage bei 37°C in 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Formel für eine Zählkammer nach Neubauer:

$$\frac{\text{Summe der gezählten Zellen aus Quadrant I bis IV}}{4} \times 10^4/\text{ml} \times \text{ml (Volumen der Probe)} \times \text{Verdünnung}$$

4.4.3 Analyse des koloniebildenden Potentials

Sämtliche pro Blutprobe angefertigten Colony Assays wurden nach 14 Tagen Kultur mit Hilfe eines Inversionsmikroskopes ausgewertet. Hierbei wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien pro Petrischale ausgezählt und anschließend der Mittelwert pro Colony Assay errechnet.

4.5 Geräte und Materialien

4.5.1 Puffer und Medien

Erythrozytenlysepuffer

Substanzen: 8,29g Ammoniumchlorid (NH_4Cl), 1g Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO_3),
0,372g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Für die Herstellung dieses Puffers wurden die entsprechenden Mengen von Ammoniumchlorid, Kaliumhydrogenkarbonat und EDTA auf einer Feinwaage abgewogen und in einem Liter Aqua dest. aufgelöst.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

Substanzen: 0,2g/L Kaliumchlorid (KCl), 0,2g/L Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4),
8g/L Natriumchlorid (NaCl),
2,16g/L Natriumphosphatlösung ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Dieser Puffer wurde als fertige Lösung vom Hersteller (siehe Tabelle 4.5) verwendet.

Methocult GF H4435

Substanzen: Methylcellulose, fetales Rinderserum, Rinderserum Albumin,
2-Mercaptoethanol, L-Glutamin, rh Stammzellfaktor,
rh GM-CSF, rh G-CSF, rh IL-3, rh IL-6, rh Erythropoetin

Diese Methylcellulose enthält alle Faktoren für einen hämatopoetischen Kolonie Ansatz.

Methocult H4230

Substanzen: Methylcellulose, fetales Rinderserum, Rinderserum Albumin,
2-Mercaptoethanol, L-Glutamin

80 ml dieser Methylcellulose wurden mit 20 ml Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), einem Vail SCGF und einem halben Vail VEGF versetzt und gut gemischt. Diese angemischte Methylcellulose wurde für den endothelialen Kolonie Ansatz verwendet.

4.5.2 Bezugquellen der Geräte und Materialien

Tabelle 4.4: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Motorpipette	pipet-aid	drummond, Pensylvania, USA
Pipetten 100µl, 1000µl, 5000µl	eppendorf research	eppendorf, Hamburg, D
Schüttler	KS 501 digital	ika Labortechnik, Stauffen, D
Feinwaage	Adventurer AR 2140	Ohaus Corp., New York, USA
Zentrifuge	Centrifuge 58102	eppendorf, Hamburg, D
Durchflusszytometer	FACS Canto	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Wasserbad	W6	medingen, Dresden, D
Sterilbank	HERA safe	Heraeus instruments, Düsseldorf, D
Inkubator	Typ B 5060 EC-CO2	Heraeus instruments, Düsseldorf, D
Zählkammer	Neubauer	Optik Labor, Balgach, CH
Inversionsmikroskop	Olympus IX50	Olympus Optical Corp., Hamburg, D
Digitalkamera	Olympus C5050 Zoom	Olympus Optical Corp., Hamburg, D

Tabelle 4.5: Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Gibco invitrogen, Karlsruhe, D
Aqua dest.	Baxter Deutschland, Unterschleißheim, D
Puffer und Salze: Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) Kaliumchlorid (KCl) Kaliumhydrogenkarbonat (KHCO ₃) Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Natriumchlorid (NaCl) Natriumphosphatlösung (Na ₂ HPO ₄ -7H ₂ O)	Merck Chemicals, Darmstadt, D
Humane Wachstumsfaktoren: VEGF, SCGF	TEBU, Offenbach, D
Methocult GF H4435	Stem Cell Technologies, via CellSystems, St. Katharinen, D
Methocult H4230	Stem Cell Technologies, via CellSystems, St. Katharinen, D
IMDM	Gibco invitrogen, Karlsruhe, D

Tabelle 4.6: Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse

Antikörper	Spezies	Klon Nr.	Hersteller, Stadt, Land
CD133-PE	Maus anti-human monoklonal	AC141	Milteny Biotec, Bergisch-Gladbach, D
CD45-PE	Maus anti-human monoklonal	HI30	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, D
c-kit-PE	Maus anti-human monoklonal	104D2	Dako Cytomation, Hamburg, D
bcrp-1-PE	Maus anti-human monoklonal	5D3	eBioscience, Frankfurt, D
CD45-FITC	Maus anti-human monoklonal	HI30	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, D
CD14-FITC	Maus anti-human monoklonal	M5E2	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, D
CD34-FITC	Maus anti-human monoklonal	8G12	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, D
CXCR4-FITC	Maus anti-human monoklonal	12G5	R&D Systems, Wiesbaden, D
$\gamma 1/\gamma 1$ (IgG ₁ /IgG ₁) PE/FITC	Maus anti-human monoklonal	X40	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, D
$\gamma 1/\gamma 2$ (IgG ₁ /IgG ₂) PE/FITC	Maus anti-human monoklonal	X39	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg, D
FcR-Blocking Reagent	Maus anti-human monoklonal		Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, D

Tabelle 4.7: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller (Stadt, Land)
heparinisierte Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kanülen	Braun, Melsungen, D
FACS Messröhrchen, 5ml	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Zentrifugenröhrchen, 50ml	Cellstar, greiner bio-one, Essen, D
Pipettenspitzen, steril und unsteril	eppendorf, Hamburg, D
Glaspipetten, steril	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Filter, 22µm, 500ml	Corning, Pennsylvania, USA
Glaswaren	Schott Duran, Wertheim/Main, D
Deckgläser	Marienfild superior, Lauda-Königshofen, D
Petri Schalen (Durchmesser 35mm, 100mm)	nunc, Roskilde, Dänemark

4.6 Graphische Darstellung und statistische Methoden

Alle durchflusszytometrisch gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Software BD FACS Diva, Version 4.1.2 (Becton Dickinson, Heidelberg, D) analysiert.

Die Ergebnisse der analysierten Parameter, bestehend aus der durchflusszytometrisch gemessenen Anzahl mobilisierter Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt sowie der Anzahl gebildeter Kolonien in den Colony Assays, sind dargestellt als Mittelwerte \pm standard error of the mean (SEM). Alle daraus erstellten Diagramme (in Kapitel 5) wurden durch das Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Kalifornien, USA) erstellt.

Die statistische Korrelation der Mobilisierung CD133-, c-kit- und bcrp-1-positiver Zellen (siehe Kapitel 5.1.6) und der Mobilisierungsverläufe bei Lebererkrankten und Lebergesunden (siehe Kapitel 5.1.7) erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Kalifornien, USA). Dabei wurde die Verteilung der Messwerte mittels Kolmogorov-Smirnov-Test untersucht. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem Mann-Whitney U-Test geprüft. Bivariate Korrelationen wurden mittels Spearman's rho (nicht-normalverteilte Variablen) untersucht. Ein P-Wert von kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant erachtet. Die Tabellen zu diesen statistischen Auswertungen sind in Kapitel 9.1.2 und 9.1.3 abgebildet.

5 Ergebnisse

5.1 Durchflusszytometrische Analysen

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurden Blutproben des Kollektivs I von sechs Patienten, die sich einer Leberresektion unterziehen mussten (Patient Nr. 1 bis 6) und einem Leberlebendspender (Spender Nr. 5) verwendet.

Da sich beim Dot Plot der FSC/SSC-Analysen Stamm- und Progenitorzellen in der Monozyten- und Lymphozytenpopulation abbilden, bezieht sich die Auswertung nur auf diese beiden Populationen. Zusammen werden diese Populationen als mononukleäre Zellfraktion (MNC) bezeichnet. Darstellungen des zeitlichen Verlaufs und Angaben von Prozentwerten beziehen sich, soweit nicht anders angegeben, auf die MNC der Leukozyten. Stammzellmarker-positive Zellpopulationen wurden dann als signifikant erachtet, wenn deren Anteil an der MNC mehr als 0,5% betrug.

5.1.1 Quantifizierung und Phänotypisierung CD133-positiver Zellen

Patienten mit Lebererkrankungen:

Alle Patienten zeigten bereits präoperativ eine signifikant erhöhte Anzahl zirkulierender CD133-positiver (⁺) Zellen in der MNC (0,6% bis 5%, Mittelwert: 2,3%, SEM: 0,8), wie in Abbildung 5.1 dargestellt. Alle CD133⁺ Zellen wiesen während des gesamten erfassten Zeitraums auch den hämatopoetischen Marker CD45 auf. Diese Population CD133⁺/CD45⁺ Zellen nahm im Verlauf zunächst leicht zu und ab dem dritten postoperativen Tag deutlich ab (Abbildung 5.1). Die CD133⁺/CD45⁺ Zellen wiesen keine signifikante Koexpression des Stammzellmarkers CD34 auf.

Der Monozytenmarker CD14 wurde über den gesamten Zeitraum koexprimiert. Diese CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Population war bei allen Patienten nachweisbar und fand sich stets in der Monozytenpopulation (Abbildung 5.2). Bei vier von sechs Patienten jedoch zeigte sich ein kleinerer Teil der mobilisierten CD133⁺/CD45⁺ Zellen (0,7% ± 0,3%) vor allem präoperativ und 24 Stunden nach dem Eingriff negativ für CD14. Der Anteil der CD133⁺/CD45⁺/CD14⁻ Zellen an allen CD133⁺/CD45⁺ Zellen betrug bei diesen vier Patienten zu den signifikanten Zeitpunkten im Mittel 32% (SEM 3,9%). Diese

CD133⁺/CD45⁺/CD14⁻ Population war hingegen stets in der Lymphozytenpopulation zu beobachten (Abbildung 5.1 und 5.2).

Bei vier Patienten (Patient Nr. 1 bis 4) exprimierte ein Teil der CD133⁺ Population besonders präoperativ ($1,2\% \pm 0,6\%$) sowie zwölf ($0,7\% \pm 0,4\%$) und 24 Stunden ($1,2\% \pm 0,4\%$) postoperativ den SDF-1 Rezeptor CXCR4. Diese CD133⁺/CXCR4⁺ Population war überwiegend in der Monozytenpopulation darstellbar (Abbildung 5.2).

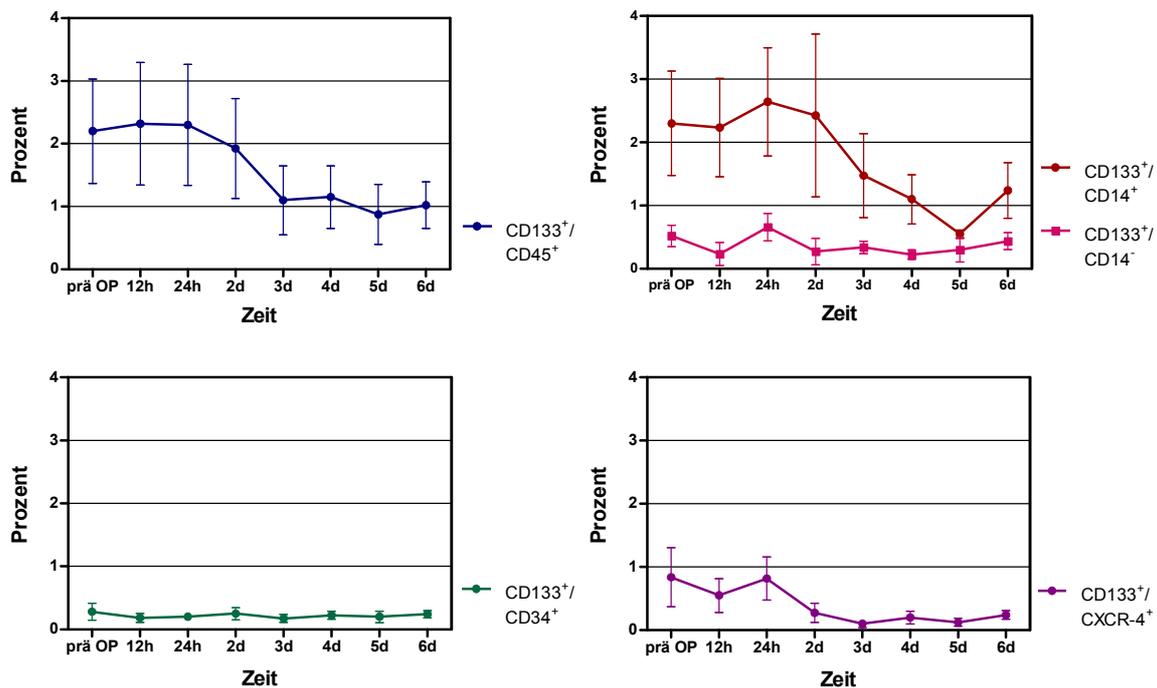


Abb. 5.1: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der mobilisierten CD133⁺/CD45⁺, CD133⁺/CD14⁺, CD133⁺/CD14⁻, CD133⁺/CD34⁺ und CD133⁺/CXCR4⁺ Zellen nach Leberresektion, n=6.

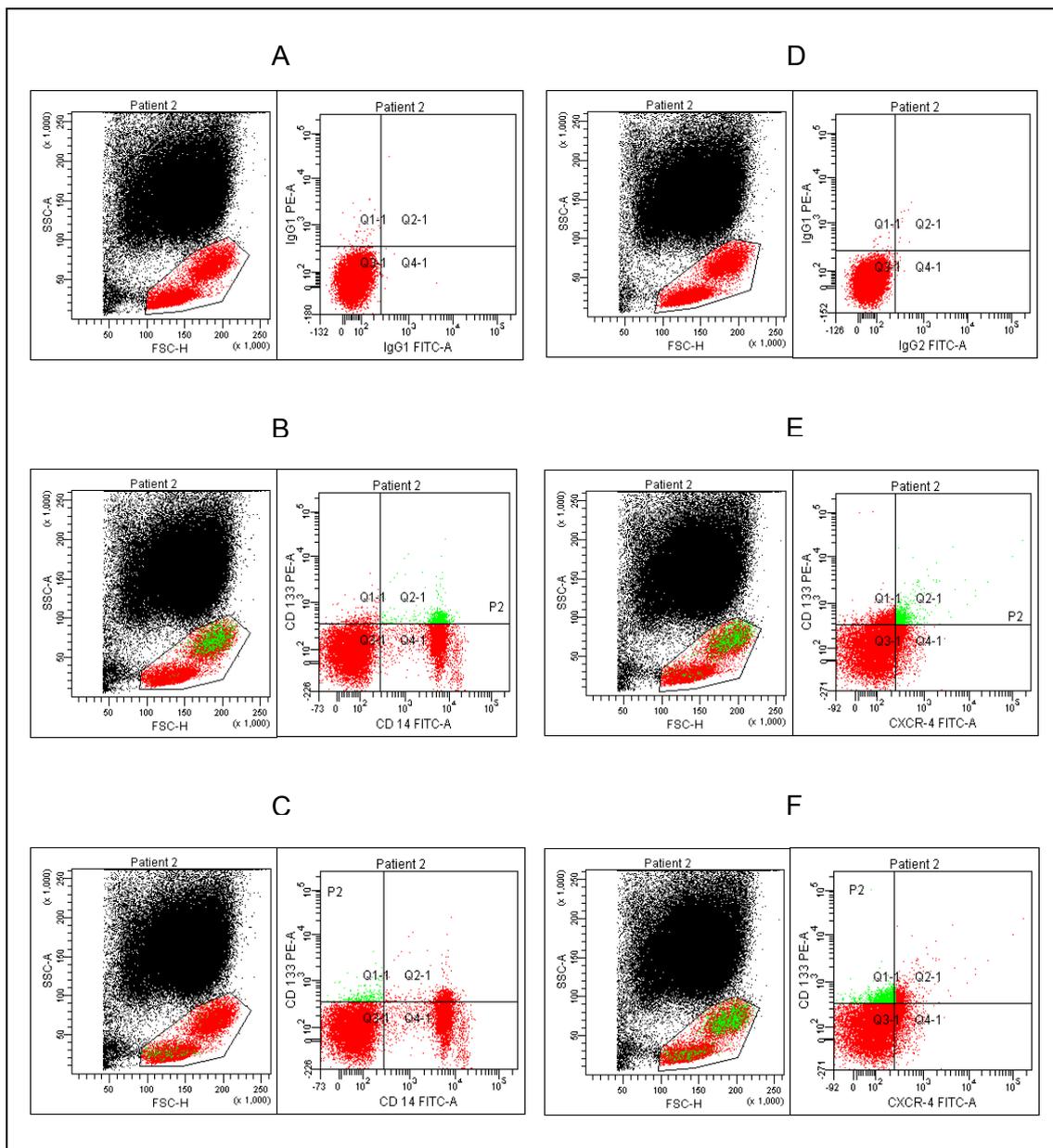


Abb. 5.2: Durchflusszytometrische Analysen der CD133⁺ Populationen eines Patienten vor Leberresektion. Die CD133⁺/CD14⁺ Zellen sind überwiegend in der Monozytenpopulation (B) und die CD133⁺/CD14⁻ Zellen in der Lymphozytenpopulation (C) erkennbar. E zeigt die CD133⁺/CXCR4⁺ Zellen überwiegend in der Monozytenpopulation. CD133⁺/CXCR4⁻ Zellen sind sowohl in der Monozyten- als auch in der Lymphozytenpopulation nachweisbar (F). A: Isotypkontrolle für B und C. D: Isotypkontrolle für E und F.

Leberlebendspender:

Es zeigte sich zwölf Stunden nach dem Eingriff ein signifikanter Anstieg (5,6%) CD133⁺/CD45⁺ Zellen (Abbildung 5.3). Darüber hinaus exprimierten alle CD133⁺ Zellen zwölf und 24 Stunden nach der Operation den Monozytenmarker CD14 und ein geringer Teil (1,3%) zwölf Stunden nach der Operation zusätzlich CD34. Bei den mobilisierten Zellen handelte es sich somit um eine CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Population, die überwiegend CD34 negativ war. Der CD133⁺/CD45⁺/CD34⁺ Anteil stellte sich nur in der Monozytenpopulation dar (Abbildung 5.4).

Unerwarteterweise fand sich bereits präoperativ ein erhöhter Anteil CD133⁺ Zellen (2,9%), welcher ebenfalls eine CD133⁺/CD45⁺/CD34⁻/CD14⁺ Population aufwies, die sich entsprechend den Befunden nach Leberresektion überwiegend in der Monozytenpopulation darstellte. Im Unterschied zu der postoperativ mobilisierten Population wurde präoperativ zusätzlich eine CD133⁺/CD45⁺/CD34⁻ Population nachgewiesen, welche negativ für CD14 war. Diese CD133⁺/CD14⁻ Zellen waren nur in der Lymphozytenpopulation nachweisbar, entsprechend der CD133⁺/CD14⁻ Zellen der Patienten des Kollektivs I. Dieses Phänomen des Auftretens CD14-positiver und -negativer Progenitoren war am dritten Tag nach dem operativen Eingriff erneut signifikant darstellbar, wie in Abbildung 5.3 und 5.4 gezeigt.

Zudem exprimierte über den gesamten Zeitraum ein signifikanter Anteil der CD133⁺ Zellen CXCR4 (25% der CD133⁺ Zellen). Mit dem postoperativen Anstieg der CD133⁺ Zellen stieg auch die CD133⁺/CXCR4⁺ Population an (Abbildung 5.3). Diese Population war nur im monozytären Anteil der MNC darstellbar (Abbildung 5.5).

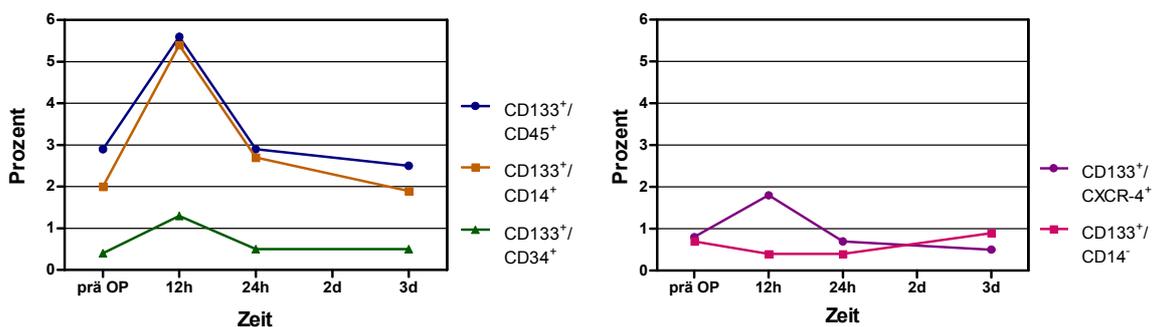


Abb. 5.3: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zirkulierenden CD133⁺/CD45⁺, CD133⁺/CD14⁺, CD133⁺/CD34⁺, CD133⁺/CXCR4⁺, und CD133⁺/CD14⁻ Zellen nach Leberlebendspende, n=1. (prä OP: präoperativ, h: Stunden, d: Tag)

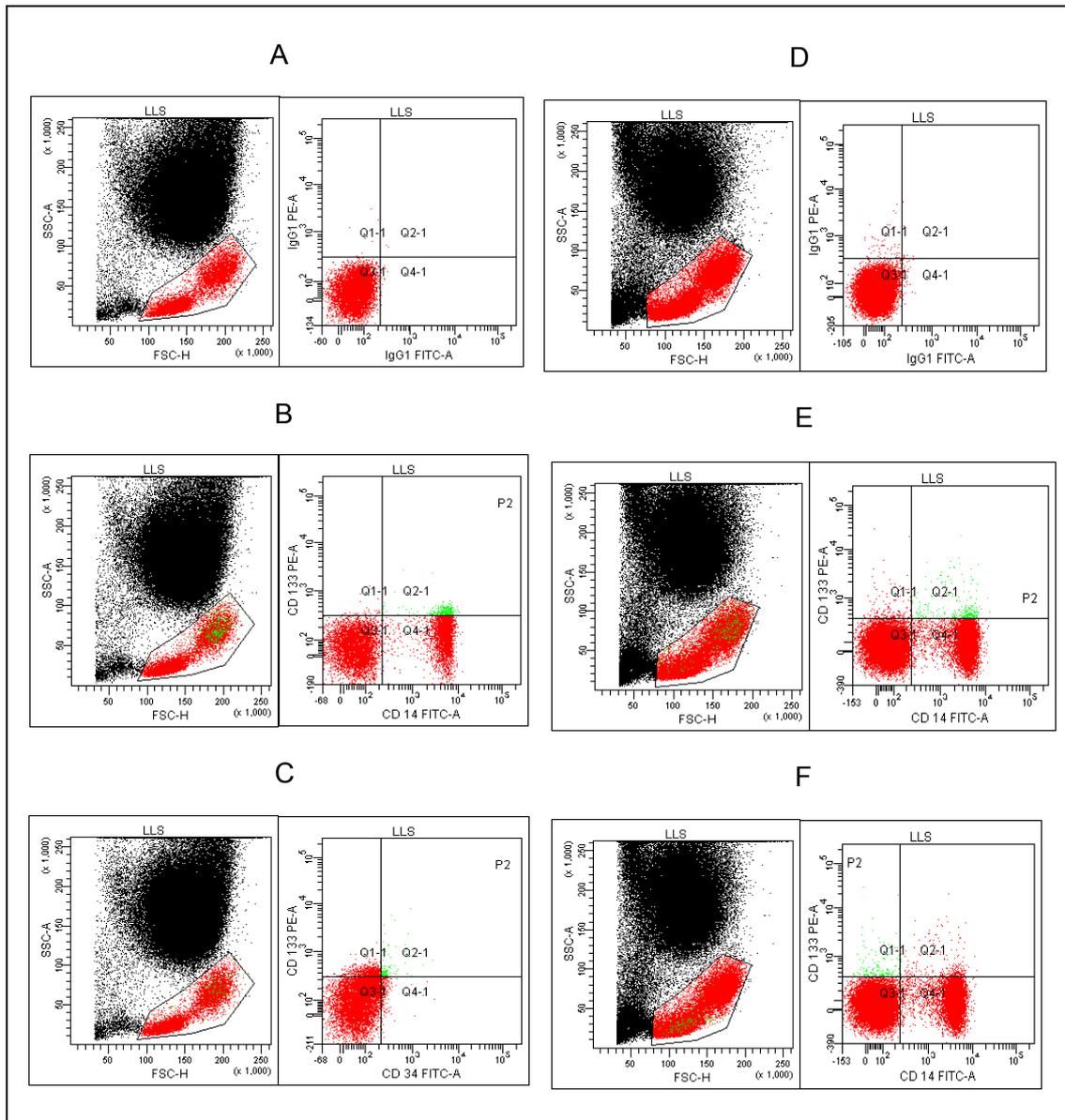


Abb. 5.4: Durchflusszytometrische Analysen der mobilisierten CD133⁺ Populationen nach Leberlebendspende. Zwölf Stunden postoperativ zeigten sich die CD133⁺ Zellen allesamt positiv für CD14 (B) und teilweise für CD34 (C), repräsentativ dargestellt für 24 Stunden postoperativ. Am dritten postoperativen Tag erkennt man deutlich in der Monozytenpopulation die CD133⁺/CD14⁺ Zellen (E) und in der Lymphozytenpopulation die CD133⁺/CD14⁻ Zellen (F). Im oberen Teil der Abbildung sind die entsprechenden Isotypkontrollen dargestellt (A für B und C, D für E und F).

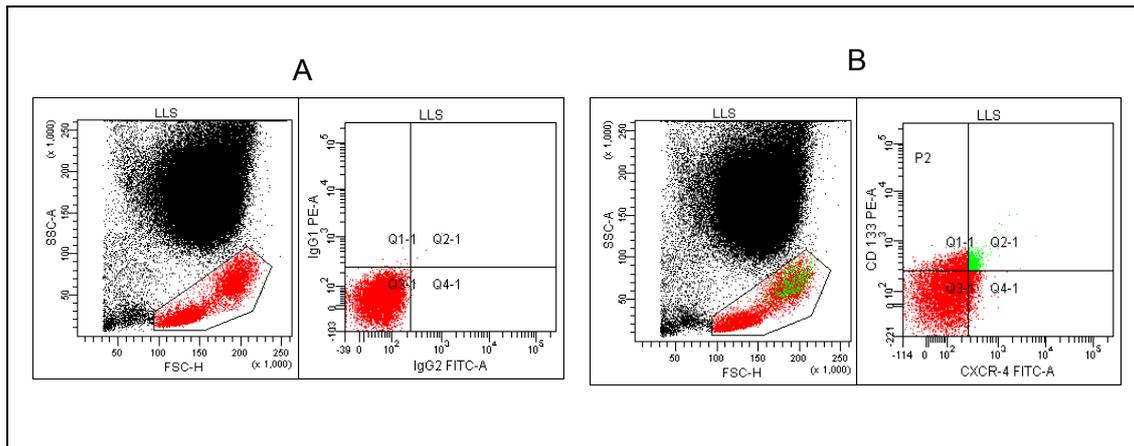


Abb. 5.5: Phänotypische Charakterisierung der mobilisierten CD133⁺ Populationen zwölf Stunden nach Leberlebendspende. Die CD133⁺/CXCR4⁺ stellen sich nur in der Monozytenpopulation dar (B). A: Isotypkontrolle für B.

5.1.2 Mobilisierung CD34-positiver Zellen

Patienten mit Lebererkrankungen:

In der mononukleären Zellfraktion war eine geringe Mobilisierung CD34⁺ Zellen am sechsten postoperativen Tag (0,6% ± 0,1) nachweisbar. Die zirkulierenden CD34⁺ Zellen koexprimierten stets CD45. Eine signifikante Mobilisierung c-kit oder bcrp-1 koexprimierender Zellen fand sich nicht (Abbildung 5.6).

Bei zwei Patienten (Patient Nr. 2, 24h postoperativ und Patient Nr. 3 am Tag 5 und 6 postoperativ) betrug jedoch der Anteil der mobilisierten CD34⁺ Zellen in der MNC über ein Prozent. Ein Teil dieser Zellen koexprimierte c-kit, für bcrp-1 zeigten sich alle CD34⁺ Zellen negativ. Es handelte sich demnach um eine CD34⁺/CD45⁺/c-kit⁺/bcrp-1⁻ Population (Abbildung 5.7).

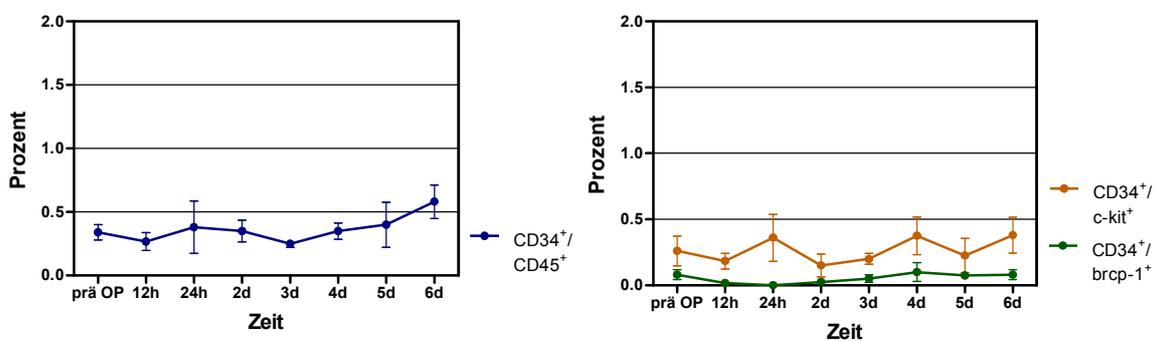


Abb. 5.6: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zirkulierenden CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/c-kit⁺ und CD34⁺/bcrp-1⁺ Zellen, n=6.

Leberlebendspender:

Es fand sich ein geringer postoperativer Anstieg CD34⁺ Zellen (0,8%) in der MNC zwölf und 24 Stunden postoperativ (Abbildung 5.8). Diese Zellen exprimierten während des gesamten erfassten Zeitraums CD45. Zwölf Stunden postoperativ koexprimierten diese CD34⁺/CD45⁺ Zellen außerdem c-kit (Abbildung 5.8). Eine signifikante Koexpression des Stammzellmarkers bcrp-1 fand sich hingegen zu keinem Zeitpunkt.

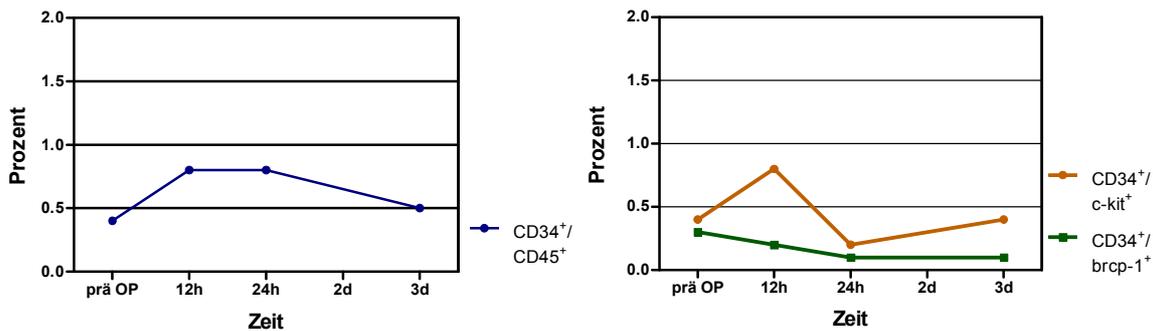


Abb. 5.8: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der mobilisierten CD34⁺/CD45⁺, CD34⁺/c-kit⁺ und CD34⁺/bcrp-1⁺ Zellen nach Leberlebendspende.

5.1.3 Expression der Stammzellmarker c-kit und bcrp-1

Patienten mit Lebererkrankungen:

Bei allen Patienten war bereits präoperativ eine erhöhte Anzahl c-kit⁺ Zellen nachweisbar (2,5% ± 0,7%). Zwölf Stunden nach dem operativen Eingriff zeigte sich ein weiterer Anstieg auf 4,1% ± 0,9% (Abbildung 5.9). Im weiteren Verlauf lag der Anteil c-kit⁺ Zellen weiterhin leicht über präoperativem Niveau.

Ein Teil dieser c-kit⁺ Zellen exprimierte CXCR4 (c-kit⁺/CXCR4⁺ gemessen an der MNC: prä OP 1,1% ± 0,4%, 12h post OP 3,2% ± 1%, 24h post OP 1,8% ± 0,5%). Diese doppelt positiven Zellen waren überwiegend im Bereich der monozytären Population darstellbar, während die c-kit⁺/CXCR4⁻ Zellen sowohl in der Monozyten- als auch in der Lymphozytenpopulation zu beobachten waren (Abbildung 5.11).

Die Anzahl zirkulierender bcrp-1⁺ Zellen zeigte im zeitlichen Verlauf im Gegensatz zu c-kit⁺ kaum signifikante Anstiege. Bei vier Patienten ließen sich bcrp-1⁺ Zellen im Bereich von einem Prozent nachweisen, die vor allem präoperativ darstellbar waren (Abbildung 5.10 und 5.11).

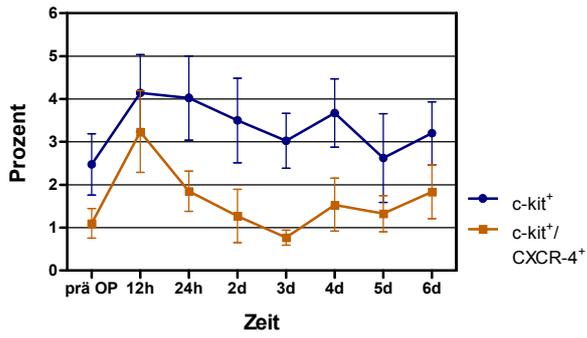


Abb. 5.9: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der c-kit⁺ und c-kit⁺/CXCR-4⁺ Zellen nach Leberresektion, n=5.

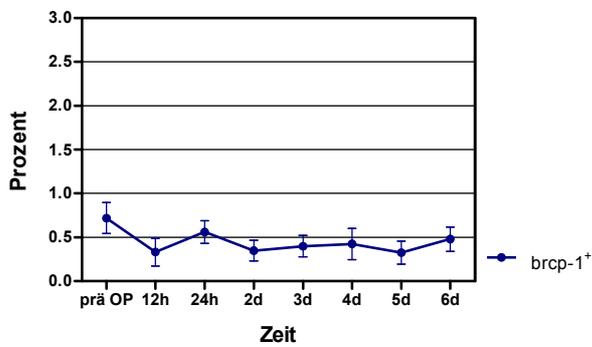


Abb. 5.10: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der bcrp-1⁺ Zellen nach Leberresektion, n=6.

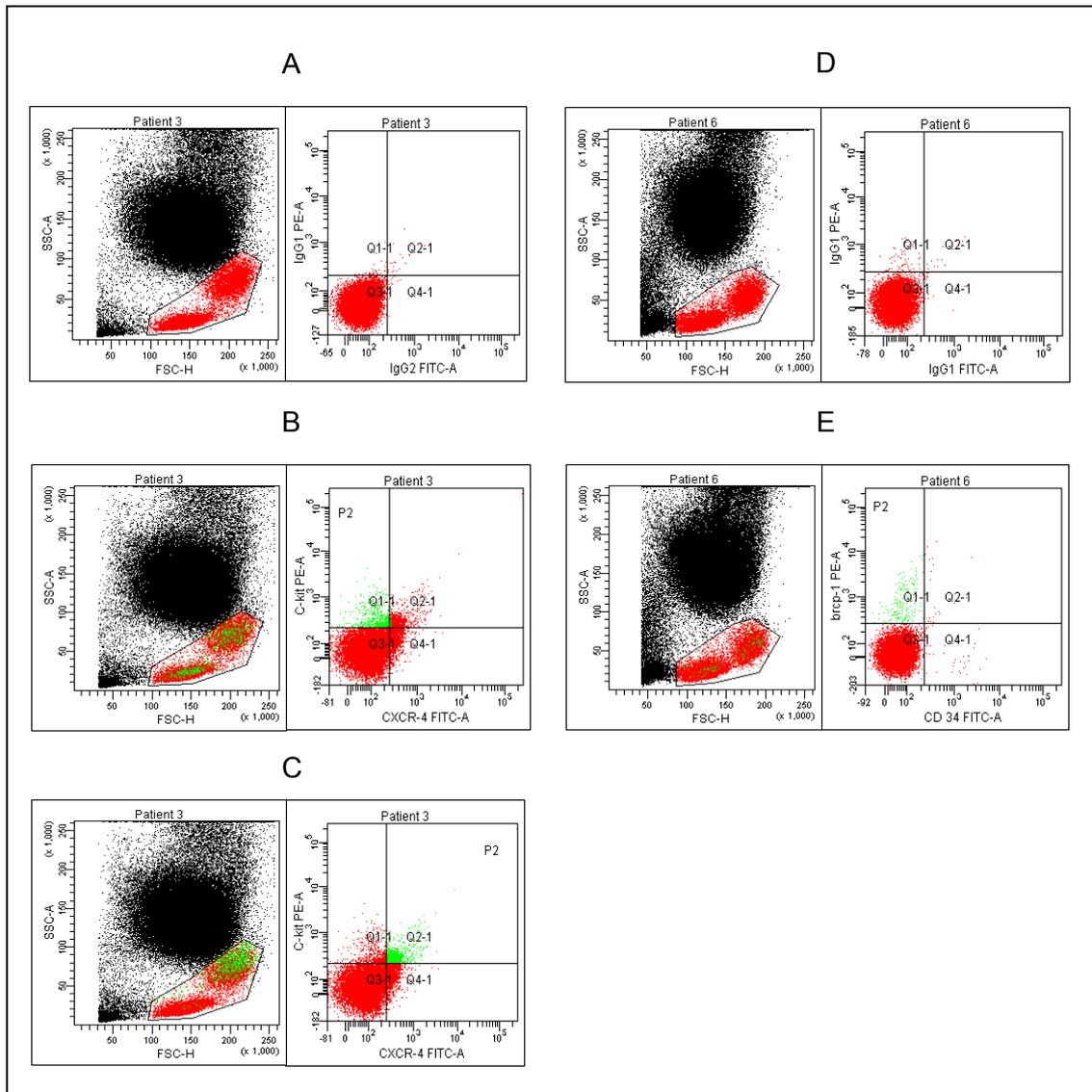


Abb. 5.11: Darstellung der $c\text{-kit}^+$, $c\text{-kit}^+/\text{CXCR4}^+$ und bcrp-1^+ Populationen vor und nach Leberresektion. Es sind die $c\text{-kit}^+$ (B) und $c\text{-kit}^+/\text{CXCR-4}^+$ (C) Zellen von Patient Nr. 3 zwölf Stunden nach dem Eingriff repräsentativ für alle Patienten abgebildet. E zeigt die präoperativ erhöhte Anzahl zirkulierender bcrp-1^+ Zellen des Patienten Nr. 6. A und D: Isotypkontrollen.

Leberlebensspender:

Über den gesamten erfassten Zeitraum war eine erhöhte Anzahl zirkulierender $c\text{-kit}^+$ Zellen nachweisbar, wobei sich zwölf Stunden nach der Operation ein deutlicher Anstieg auf 14,5% fand (Abbildung 5.12). Ein Teil der $c\text{-kit}^+$ Zellen exprimierte, entsprechend den Befunden des Kollektivs I, über den gesamten erfassten Zeitraum ebenfalls CXCR4. Diese $c\text{-kit}^+/\text{CXCR4}^+$ Zellen waren überwiegend in der Monozytenpopulation zu beobachten (Abbildung 5.12 und 5.14).

Ein signifikanter Anstieg von bcrp-1^+ Zellen war postoperativ nicht zu verzeichnen (Abbildung 5.13).

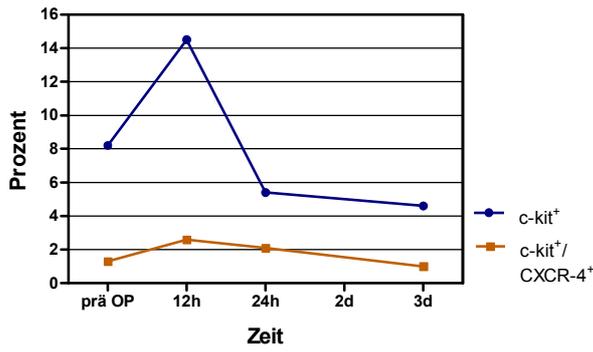


Abb. 5.12: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zirkulierenden c-kit⁺ und c-kit⁺/CXCR4⁺ Zellen nach Leberlebenspende.

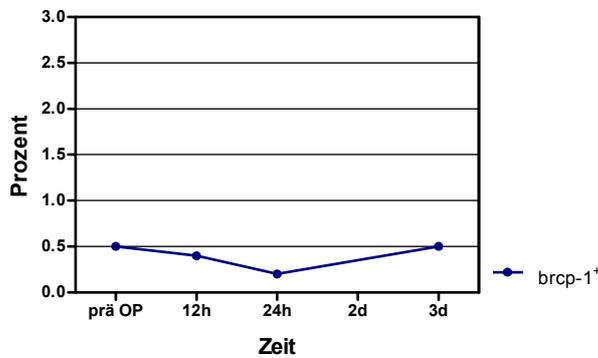


Abb. 5.13: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der zirkulierenden bcrp-1⁺ Zellen nach Leberlebenspende.

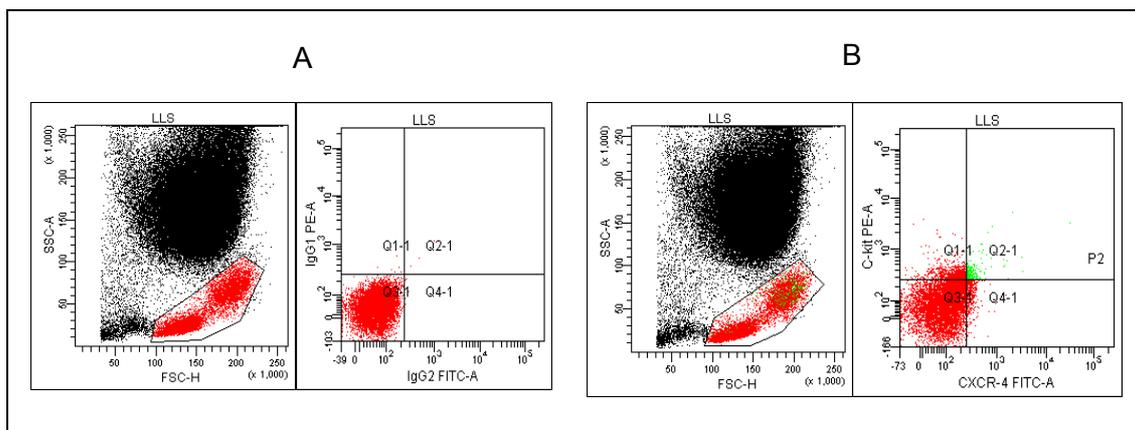


Abb. 5.14: Durchflusszytometrische Analysen der c-kit⁺ und c-kit⁺/CXCR4⁺ Populationen zwölf Stunden nach Leberlebenspende. Die c-kit⁺/CXCR4⁺ Zellen (B) sind überwiegend in der Monozytenpopulation zu beobachten. A: Isotypkontrolle.

5.1.4 Mobilisierung CD14-positiver Zellen

Patienten mit Lebererkrankungen:

Bereits präoperativ lag der Anteil CD14⁺ Zellen mit 34% ± 7% in der MNC sehr hoch (Abbildung 5.15). Postoperativ fanden sich innerhalb des Kollektivs sehr variable Verläufe, wobei insgesamt Anstiege zu verzeichnen waren bei zwölf Stunden (42% ± 6,24%), drei Tage (43% ± 10,33%) und vier Tage (46% ± 7,19%) nach Leberresektion. Betrachtet man den zeitlichen Verlauf der CD14⁺ Zellen innerhalb der Monozyten- und Lymphozytenpopulation getrennt voneinander, so zeigte sich in beiden Zellfraktionen ein ähnliches Muster. In beiden Populationen war eine Zunahme CD14⁺ Zellen zwölf und 24 Stunden sowie drei und vier Tage nach der Operation feststellbar (Abbildung 5.16).

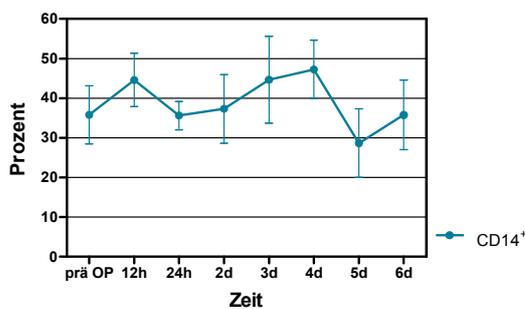


Abb. 5.15: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der CD14⁺ Zellen nach Leberresektion, n=6.

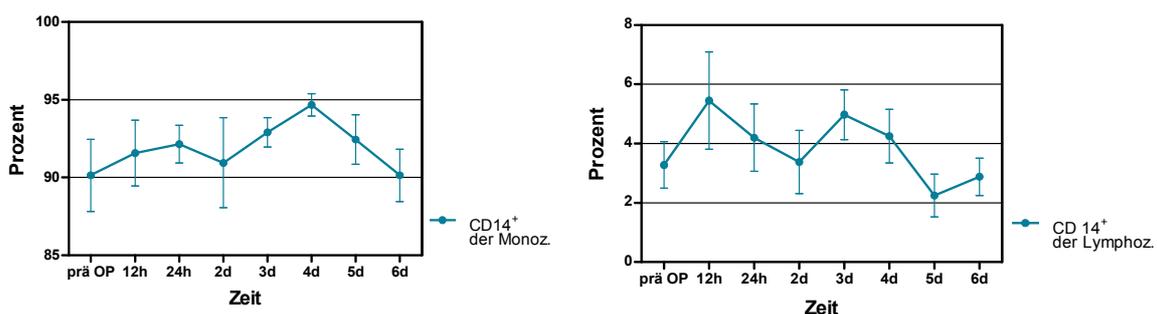


Abb. 5.16: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der CD14⁺ Zellen innerhalb der Monozyten- (links) und Lymphozytenpopulation (rechts) nach Leberresektion, n=6. (Monoz.: Monozytenpopulation, Lymphoz.: Lymphozytenpopulation)

Leberlebendspender:

Im Vergleich zu den Befunden des Kollektivs I zeigte sich erst im postoperativen Verlauf ein erhöhter Anteil $CD14^+$ Zellen in der MNC (Abbildung 5.17).

Betrachtet man auch hier die Monozyten- und Lymphozytenpopulation getrennt voneinander, so zeigte sich im Gegensatz zu den Ergebnissen des Kollektiv I in beiden Zellfraktionen ein unterschiedliches Verhalten. Die Anzahl der $CD14^+$ Zellen innerhalb der Monozytenpopulation nahm dabei von 79% präoperativ auf 90% 24 Stunden postoperativ zu. Bei den Lymphozyten hingegen zeigte sich eine Abnahme von 2,3% vor der Operation, auf 1,5% 24 Stunden nach der Operation (Abbildung 5.18). Es fand sich eine starke Abnahme der Anzahl der Lymphozyten (prä OP: ca. 13000/ μ l, 24h post OP: ca. 5000/ μ l) bei gleich bleibender Anzahl der Monozyten (ca. 3000/ μ l). Diese Veränderung des Verhältnisses innerhalb der MNC erklärt die starke Zunahme $CD14^+$ Zellen in der MNC.

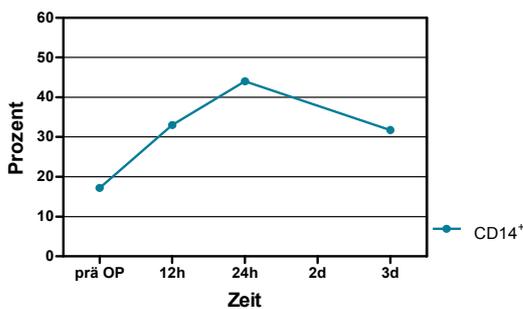


Abb. 5.17: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der $CD14^+$ Zellen nach Leberlebendspende.

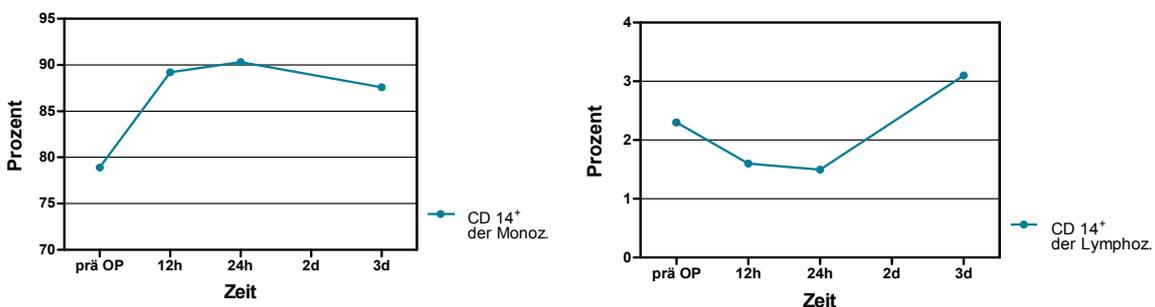


Abb. 5.18: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der prozentualen Anzahl $CD14^+$ Zellen innerhalb der Monozyten- (links) und Lymphozytenpopulation (rechts) nach Leberlebendspende. (Monoz.: Monozytenpopulation, Lymphoz.: Lymphozytenpopulation)

5.1.5 Mobilisierung CXCR4-positiver Zellen

Patienten mit Lebererkrankungen:

Alle Patienten wiesen über den gesamten Verlauf eine erhöhte Anzahl zirkulierender CXCR4⁺ Zellen in der MNC auf. Eine leicht verstärkte Mobilisierung war erst 24 Stunden nach Leberresektion feststellbar (Abbildung 5.19). Diese scheint zum Großteil auf der Zunahme CXCR4⁺ Zellen innerhalb der monozytären Zellfraktion zu beruhen (Abbildung 5.20). Allerdings ist die Anzahl mobilisierter CXCR4⁺ Zellen präoperativ bis zum zweiten postoperativen Tag innerhalb des Kollektivs sehr variabel: Bei der Hälfte der Patienten zeigte sich keine Zunahme der CXCR4⁺ Zellen innerhalb der mononukleären Zellfraktion.

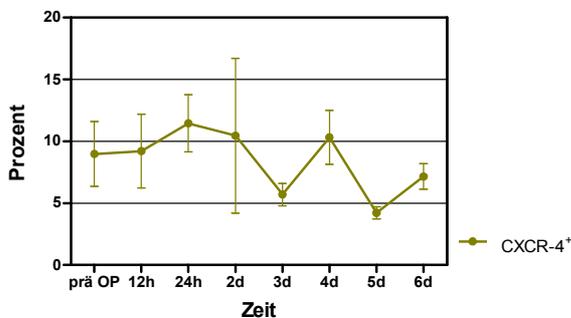


Abb. 5.19: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Anzahl CXCR4⁺ Zellen innerhalb der MNC nach Leberresektion, n=6.

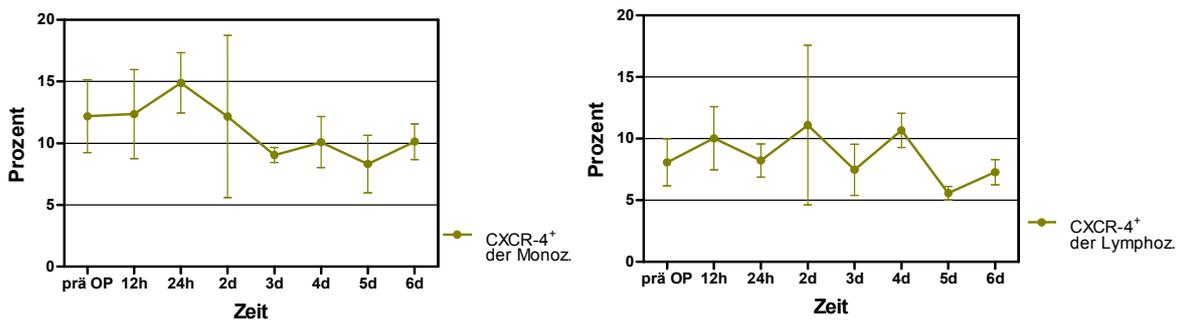


Abb. 5.20: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der CXCR-4⁺ Zellen innerhalb der Monozyten- (links) und Lymphozytenpopulation (rechts) nach Leberresektion, n=6.

Leberlebendspender:

Es fand sich ein deutlicher Anstieg CXCR4⁺ Zellen zwölf Stunden postoperativ (Abbildung 5.21). Dabei lag der Anteil CXCR4⁺ Zellen in der monozytären Zellfraktion bei 20,2% (gegenüber 10,7% präoperativ) und in der lymphozytären Zellfraktion bei 6,8% (10,7% präoperativ). Zu diesem Zeitpunkt lag eine vermehrte Mobilisierung CXCR4⁺ Zellen in der monozytären Zellfraktion vor, während in der lymphozytären Zellfraktion wiederum eine Abnahme CXCR4⁺ Zellen zu beobachten war (Abbildung 5.22).

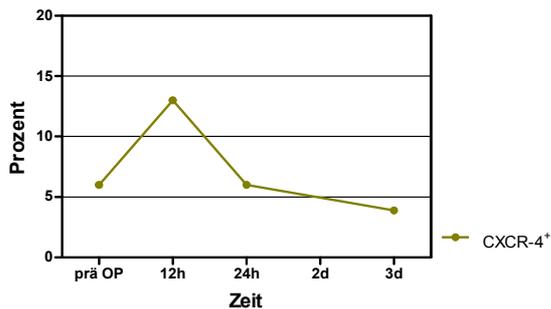


Abb. 5.21: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der CXCR4⁺ Zellen nach Leberlebendspende.

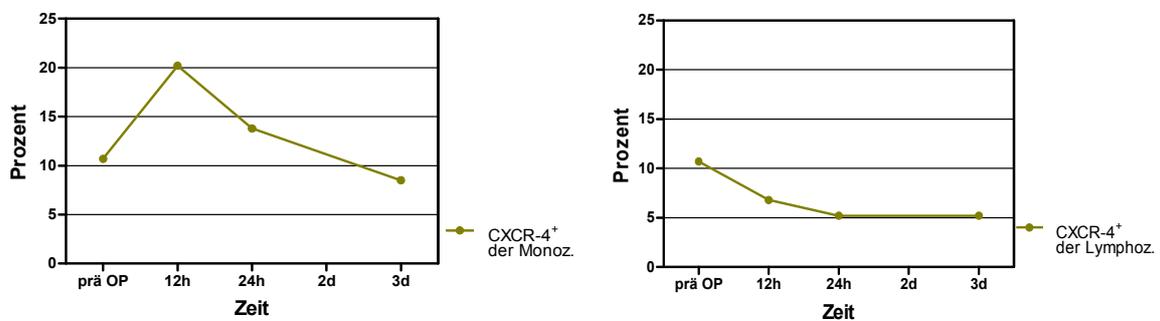


Abb. 5.22: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der CXCR4⁺ Zellen innerhalb der Monozyten- (links) und Lymphozytenpopulation (rechts) nach Leberlebendspende.

5.1.6 Korrelation der Mobilisierung CD133-, c-kit- und bcrp-1-positiver Zellen

Es wurde eine statistische Korrelationsanalyse der durchflusszytometrisch ermittelten Verläufe der mobilisierten CD133⁺, c-kit⁺ und bcrp-1⁺ Populationen durchgeführt. Dabei fand sich unter Verwendung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman's rho für nicht-normal verteilte Ereignisse keine Korrelation dieser Populationen.

Korrelationsanalysen des Alters der Patienten bzw. Spender mit der Anzahl der mobilisierten Zellpopulationen wurden aufgrund des kleinen Kollektivs nicht durchgeführt.

5.1.7 Vergleich der Mobilisierungsverläufe nach Leberresektion bei Patienten mit Lebererkrankungen und Leberlebendspendern

Für einen Vergleich der Mobilisierungsverläufe der Patienten mit denen der Leberlebendspender wurden mittels Mann-Whitney U-Test die Anzahl CD133⁺/CD45⁺ Zellen präoperativ und zwölf Stunden postoperativ ausgewertet.

Für den Vergleich der präoperativen Mobilisierung wurden Daten gesunder Probanden (n=8) herangezogen. Die Daten gesunder Probanden wurden mit freundlicher Genehmigung der Studie von Gehling et al. 2005 entnommen (Anhang Kapitel 9.1.3). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der mobilisierten CD133⁺/CD45⁺ Zellen zwischen gesunden Probanden und erkrankten Patienten (P=0,01). Hierbei war die präoperative Mobilisierung CD133⁺/CD45⁺ bei den Patienten des Kollektiv I im Gegensatz zu den gesunden Probanden deutlich erhöht. Die Mobilisierung CD133⁺/CD45⁺ Zellen nach der Operation von Patienten mit einer Lebererkrankung (n=6) zeigte im Vergleich zu Leberlebendspendern (n=11) ebenfalls einen signifikanten Unterschied (P<0,0001). Bei Leberlebendspendern stieg die Mobilisierung an, bei Kollektiv I hingegen war die Mobilisierung unverändert hoch. Die Daten der Leberlebendspender wurden ebenfalls der Studie von Gehling et al. 2005 entnommen. Ein Vergleich innerhalb des Kollektiv I zwischen der Anzahl der prä- und postoperativ mobilisierten CD133⁺/CD45⁺ Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

5.2 Evaluierung des koloniebildenden Potentials zirkulierender Leukozyten

Zur Ermittlung des koloniebildenden Potentials zirkulierender vermeintlicher Stamm- und Progenitorzellen wurden Blutproben von fünf Patienten mit einer Lebererkrankung (Patient Nr. 7 bis 11) und von fünf Leberlebendspendern (Spender Nr. 1 bis 5) präoperativ sowie zwölf Stunden postoperativ mittels Colony Assays analysiert.

5.2.1 Analyse hämatopoetischer Kolonien

Patienten mit Lebererkrankungen:

Die aus den präoperativen Blutproben gewonnenen Leukozytenpopulationen generierten im Mittel $9,8 \pm 0,7$ CFU-E, $1 \pm 0,5$ CFU-GM, $1,4 \pm 0,8$ CFU-M, $1,6 \pm 0,7$ CFU-G, $2,4 \pm 0,8$ CFU-EC like (Abbildung 5.23 und 5.25).

Es fand sich bei den Patienten nach Leberresektion eine leichte Zunahme der Anzahl der CFU-E um Faktor 1,2 und CFU-M um Faktor 1,3 (Abbildung 5.23). Darüber hinaus zeigten die aus den postoperativen Blutproben gewonnenen Leukozyten die Kapazität CFU-GEMM zu bilden. CFU-E wurden von allen analysierten prä- und postoperativ gewonnenen Leukozytenpopulationen generiert, dabei lag der präoperative Mittelwert bei $9,6 \pm 0,7$ Kolonien. Der leichte postoperative Anstieg des Mittelwertes auf $11,4 \pm 4,6$ CFU-E beruht auf einer verstärkten Koloniebildung von nur einem Patienten, bei dem präoperativ neun CFU-E und postoperativ 29 CFU-E nachweisbar waren. Bei drei Patienten zeigte sich eine Abnahme der Anzahl der CFU-E. Kolonien des Typs CFU-M fanden sich präoperativ bei drei von fünf Patienten mit einem Mittelwert von $1,4 \pm 0,8$. Eine postoperative Zunahme war nur bei zwei Patienten zu beobachten, und zwar von null auf eine Kolonie und von vier auf sieben Kolonien. Die anderen drei Patienten zeigten eine Abnahme. Zusammengefasst betrachtet war bei den Patienten nach Leberresektion nur eine geringe Zunahme der Anzahl von CFU-E und CFU-M nachweisbar. CFU-GEMM waren postoperativ nur bei einem Patienten zu verzeichnen, der nur eine Kolonie dieses Typs bildete. BFU-E fanden sich weder prä- noch postoperativ.

Eine postoperative Abnahme der Anzahl gebildeter Kolonien war für CFU-G und CFU-GM zu verzeichnen. Kolonien des Typs CFU-GM wurden präoperativ bei drei Patienten ($1 \pm 0,5$ Kolonien) und postoperativ bei zwei Patienten ($0,6 \pm 0,4$) nachgewiesen. Die

Anzahl der CFU-G zeigte postoperativ nur eine leichte Abnahme des Mittelwertes von $1,6 \pm 0,7$ auf $1,4 \pm 0,8$.

Unerwarteterweise fanden sich präoperativ bei vier Patienten Kolonien des Typs der CFU-EC like mit einem Mittelwert bei $2,4 \pm 0,8$ (Abbildung 5.25 D). Diese Kolonien sind normalerweise nur im Colony Assay für endotheliale Progenitorzellen zu beobachten. Auch für die Anzahl der CFU-EC-like war eine postoperative Abnahme auf $1,8 \pm 1$ zu verzeichnen .

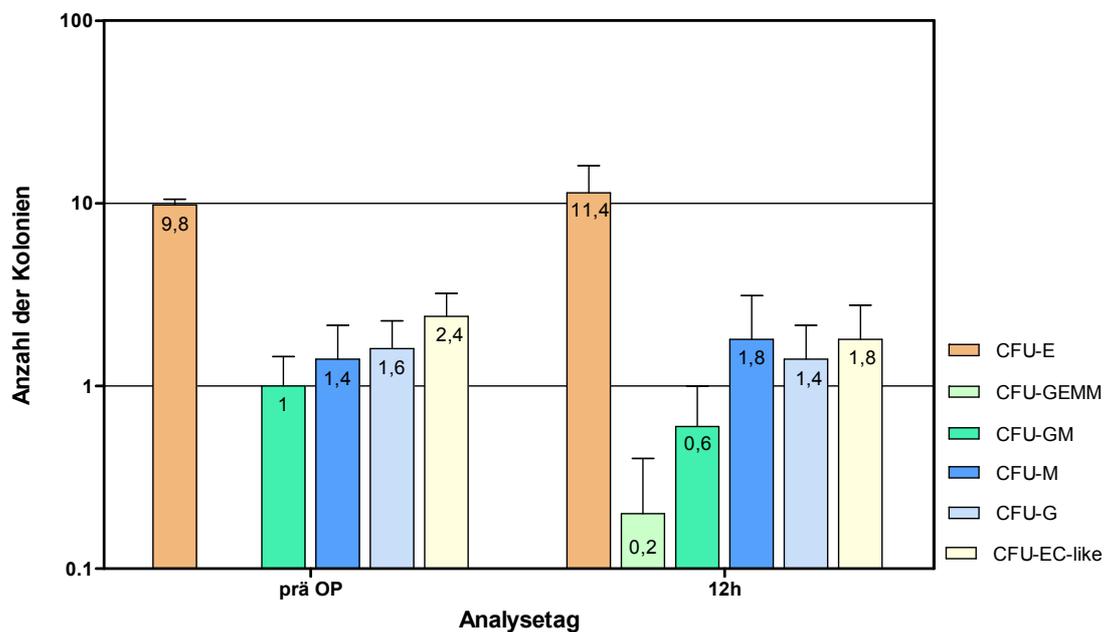


Abb. 5.23: Analyse des koloniebildenden Potentials mobilisierter Progenitorzellen mittels hämatopoetischem Assay vor und zwölf Stunden nach Leberresektion, n=5. Logarithmische Darstellung der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten. (prä OP: präoperativ, h: Stunden, CFU: colony forming unit, -E: erythrocyte, -GEMM: granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte, -GM: granulocyte monocyte, -M: monocyte, -G: granulocyte, -EC-like: endothelial cell like)

Leberlebensspender:

Es fand sich nach Leberlebensspende eine Zunahme der Anzahl generierter CFU-E, CFU-M, CFU-GM und CFU-GEMM (Abbildung 5.24 und 5.25). Präoperativ lag die Anzahl der einzelnen Kolonietypen in ähnlichen Bereichen wie bei den Patienten des Kollektiv I.

Unter allen gebildeten Kolonien waren bei den Spendern CFU-E und CFU-M sowohl prä- als auch postoperativ zahlenmäßig am stärksten vertreten, und wurden auch im

Vergleich zu den Patienten in deutlich höherem Maße postoperativ generiert. Auch in diesem Kollektiv waren CFU-E präoperativ bei allen untersuchten Proben nachweisbar. Dabei lag der Mittelwert mit $8,2 \pm 1,7$ Kolonien leicht niedriger als der Mittelwert der von den Patienten gebildeten CFU-E. Postoperativ zeigte sich eine Zunahme um den Faktor 2,8 auf $23 \pm 9,7$ Kolonien. Interessanterweise war postoperativ bei einem Spender eine Abnahme der Anzahl generierter CFU-E zu beobachten. Kolonien des Typs CFU-M fanden sich präoperativ bei vier von fünf Spendern, allerdings in geringerer Anzahl als CFU-E (CFU-M: $1,4 \pm 0,7$ Kolonien). Postoperativ war bei allen Spendern eine Zunahme der Anzahl CFU-M zu verzeichnen ($8,2 \pm 2$ Kolonien). Dies entspricht einer Vermehrung der CFU-M um den Faktor 5,9. Somit stellen CFU-M die am stärksten mobilisierte hämatopoetische Progenitorzellpopulation dar (Abbildung 5.25). Im Vergleich zum Kollektiv I war bei den Spendern postoperativ also eine deutliche Zunahme der Anzahl CFU-E und CFU-M nachweisbar. Ein wesentlich schwächerer Anstieg fand sich postoperativ für Kolonien des Typs CFU-GM. Präoperativ waren lediglich bei einem Spender zwei Kolonien dieses Typs nachweisbar. Postoperativ fanden sich CFU-GM bei zwei anderen Patienten mit einer bzw. drei gebildeten Kolonien. Dies entspricht einer Zunahme von $0,4 \pm 0,4$ auf $0,8 \pm 0,6$ Kolonien. Dennoch erreichen diese Mittelwerte der CFU-GM sowohl prä- als auch postoperativ das doppelte Niveau von dem der Patienten. Wie in Kollektiv I zeigte sich für CFU-GEMM die geringste Zunahme. Es war eine Kolonie bei nur einem Spender postoperativ nachweisbar. Kolonien des Typs BFU-E waren bei keinem Spender prä- oder postoperativ nachweisbar.

Keine Zunahme der Anzahl war für Kolonien des Typs CFU-G zu verzeichnen. Präoperativ bildeten alle Spender CFU-G ($3 \pm 1,1$ Kolonien), während postoperativ nur noch zwei Spender Kolonien dieses Typs aufwiesen. Dabei zeigte sich eine Abnahme des Mittelwertes auf $2,2 \pm 1,4$ Kolonien. Überraschenderweise fanden sich auch in diesem Kollektiv, präoperativ bei drei Spendern und postoperativ bei einem Spender, Kolonien des Typs der CFU-EC like. Im Mittel war postoperativ ebenfalls eine Abnahme der Anzahl dieser CFU-EC-like Kolonien von $1 \pm 0,5$ auf $0,6 \pm 0,6$ zu verzeichnen. Jedoch fand sich bei dem Spender, welcher postoperativ Kolonien dieses Typs bildete, ein Anstieg von 0 auf 3 Kolonien. Im Vergleich zum Kollektiv I wurde prä- und postoperativ aber nur ein Drittel der Anzahl der Kolonien der CFU-EC like gebildet.

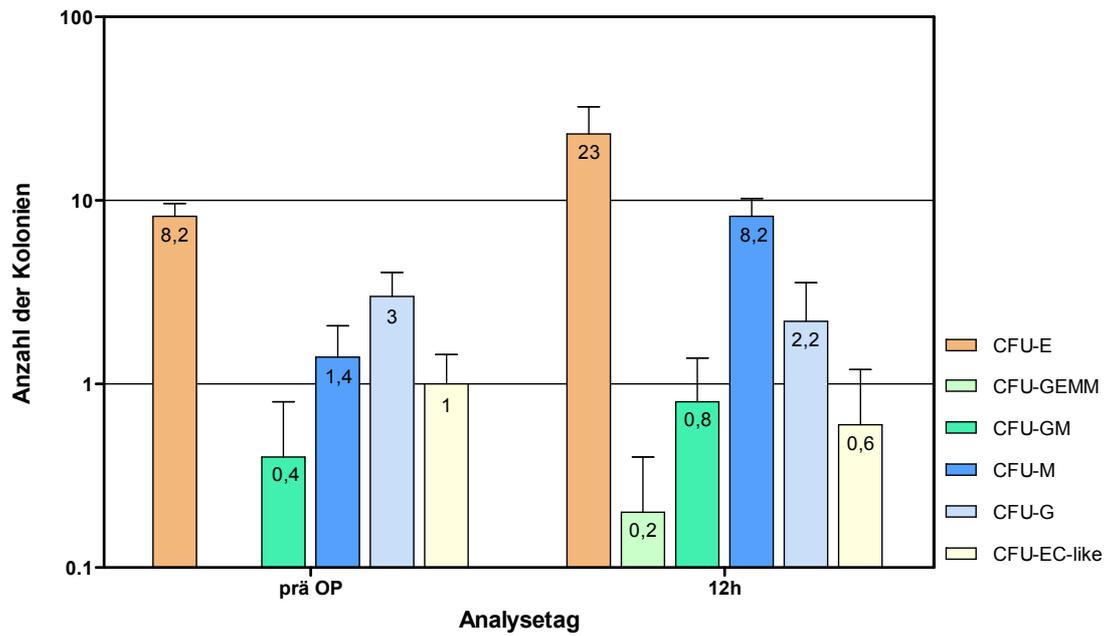


Abb. 5.24: Analyse des koloniebildenden Potentials mobilisierter Progenitorzellen mittels hämatopoetischem Assay vor und zwölf Stunden nach Leberlebenspende, n=5. Logarithmische Darstellung der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten. (prä OP: präoperativ, h: Stunden, CFU: colony forming unit, -E: erythrocyte, -GEMM: granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte, -GM: granulocyte monocyte, -M: monocyte, -G: granulocyte, -EC-like: endothelial cell like)

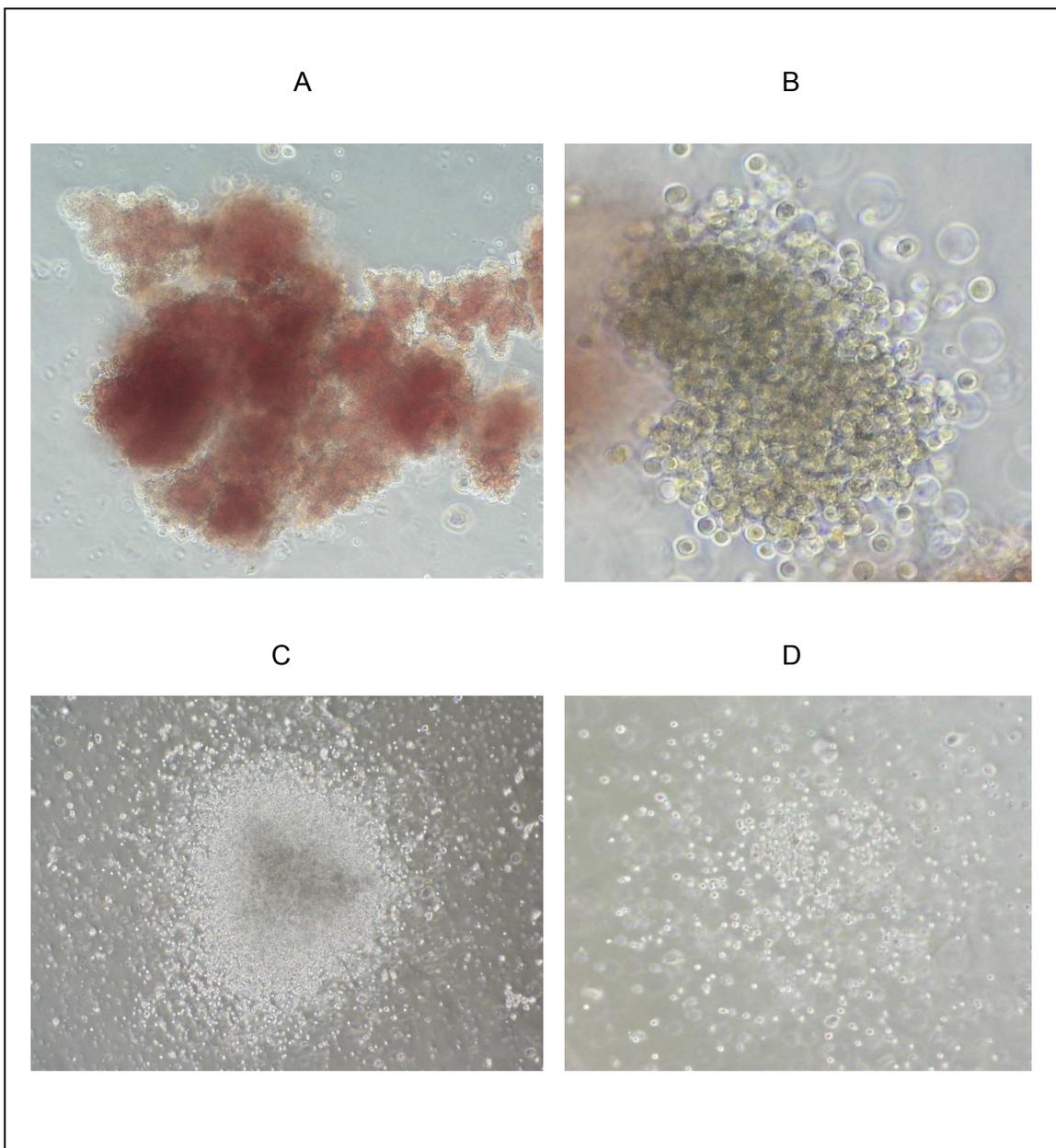


Abb. 5.25: Morphologie der von mobilisierten Progenitorzellen generierten hämatopoetischen Kolonien: Abgebildet sind Kolonien des Typs CFU-E (A) des Spender 3, CFU-M (B) von Spender 2, CFU-G (C) von Patient Nr. 10 und CFU-EC-like (D) von Patient Nr. 9. Originalvergrößerung: Bild A x 20, B x 10, C und D x 4.

Betrachtet man vergleichend die Gesamtzahl der im hämatopoetischen Assay generierten koloniebildenden Einheiten in beiden Kollektiven, so lässt sich eine eindeutige Mobilisierung hämatopoetischer Progenitorzellen nach Leberlebendspende, jedoch nicht bei den Patienten nach Leberresektion erkennen (Abbildung 5.29).

5.2.2 Analyse endothelialer Kolonien

Patienten mit Lebererkrankungen:

Kolonien des Typs CFU-EC waren sowohl prä- als auch postoperativ bei nur je einem Patienten nachweisbar, die jeweils eine CFU-EC bildeten. Ebenso fanden sich CFU-M-like Kolonien prä- und postoperativ bei nur jeweils einem Patienten. Atypische CFU-EC waren bei keinem der Patienten weder prä- noch postoperativ zu beobachten (Abbildung 5.26).

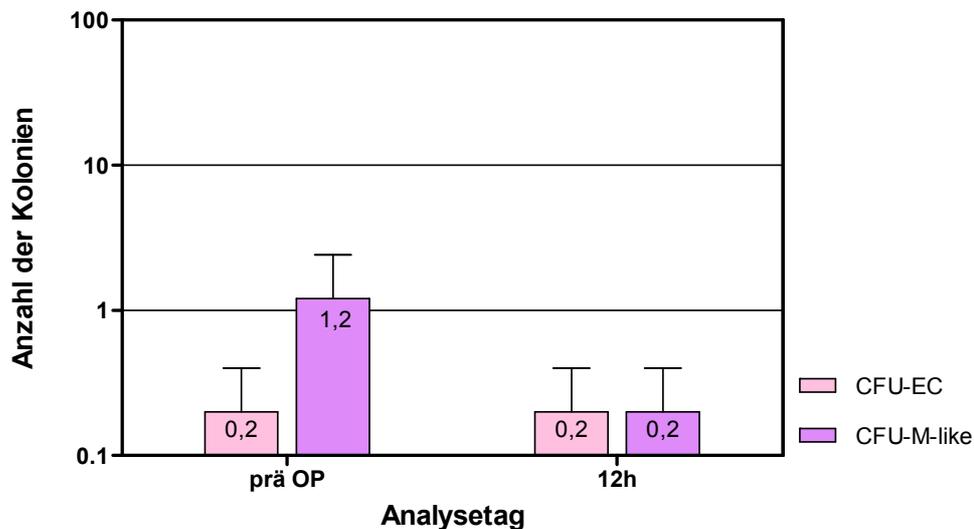


Abb. 5.26: Analyse des koloniebildenden Potentials mobilisierter Progenitorzellen mittels endotheliale Assay vor und zwölf Stunden nach Leberresektion, n=5. Logarithmische Darstellung der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten. (CFU: colony forming unit, -EC: endothelial cell, -M-like: monocyte like)

Leberlebensspender:

Dieses Kollektiv präsentierte sich im Vergleich zu den Patienten mit anderen Befunden. Präoperativ fanden sich bei drei Spendern vereinzelte CFU-EC. Interessanterweise waren postoperativ CFU-EC bei keinem Spender nachweisbar. Stattdessen waren postoperativ vermehrt CFU-M-like Kolonien zu beobachten. Während dieser Typ präoperativ nur bei einem Spender (1 Kolonie) zu verzeichnen war, bildeten postoperativ vier Spender CFU-M-like Kolonien. Der Mittelwert zeigte eine Steigerung um den Faktor 43 von $0,2 \pm 0,2$ auf $8,6 \pm 4,5$ Kolonien (Abbildung 5.27 und 5.28). Weiterhin fand sich postoperativ bei einem Spender vermehrt atypische CFU-EC, die präoperativ nur bei einem anderen Spender als Einzelkolonie zu beobachten war.

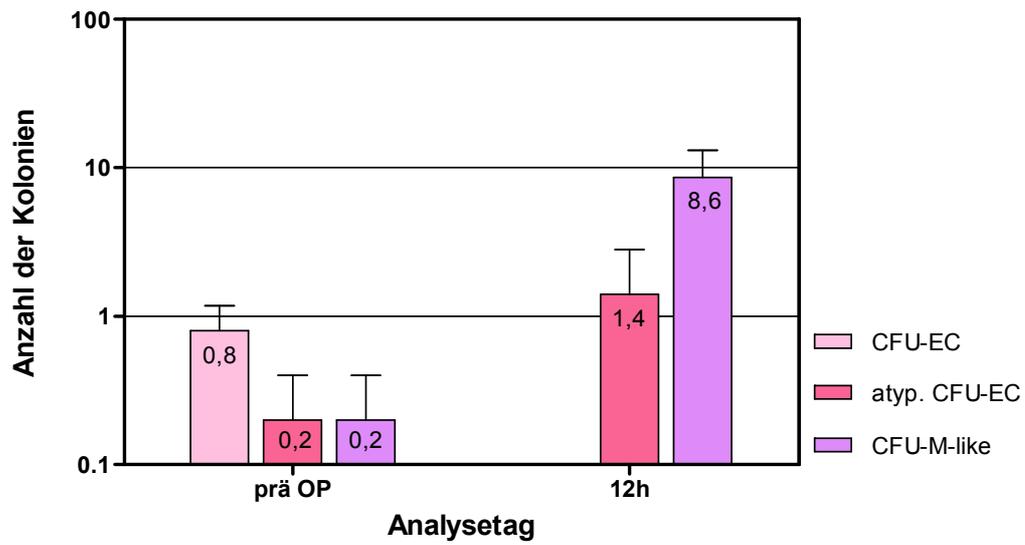


Abb. 5.27: Analyse des koloniebildenden Potentials mobilisierter Progenitorzellen mittels endothelialem Assay vor und zwölf Stunden nach Leberlebendspende, n=5. Logarithmische Darstellung der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten. (CFU: colony forming unit, -EC: endothelial cell, atyp: atypische, -M-like: monocyte like)

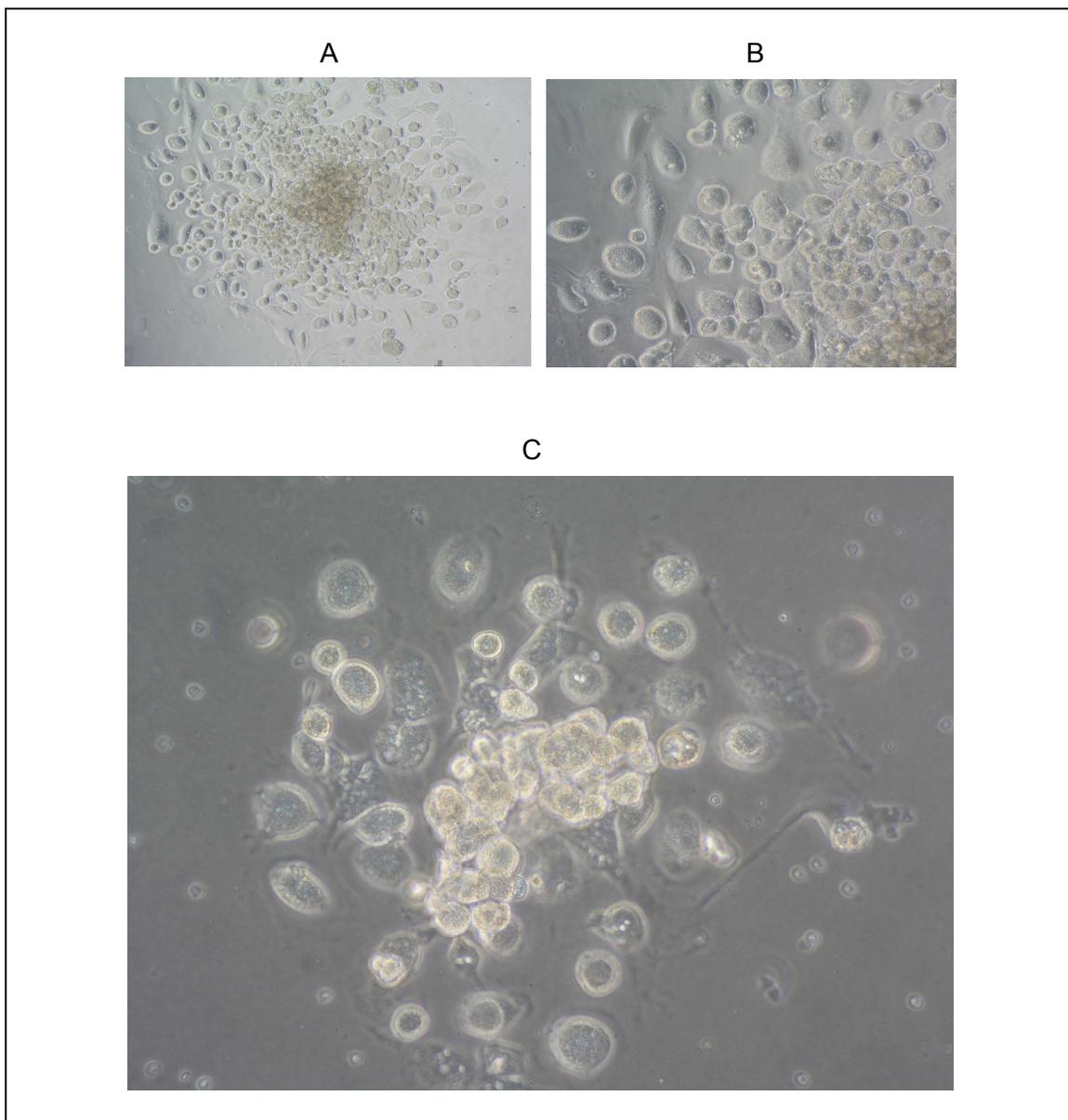


Abb. 5.28: CFU-M-like Kolonien, Analysetag: zwölf Stunden nach Leberlebendspende. CFU-M-like Kolonie (A), und Ausschnitt (B) aus in A gebildeter Kolonie. Weitere CFU-M-like Kolonie (C), mit ähnlicher Morphologie wie in A. Originalvergrößerung: A x 10, B x 20, C x 40.

Betrachtet man auch hier vergleichend die Gesamtzahl der prä- und postoperativ gebildeten Kolonien beider Kollektive, so lässt sich postoperativ eine eindeutige Zunahme der Anzahl endothelialer Kolonien nach Leberlebendspende nicht jedoch nach Leberresektion der Patienten feststellen (Abbildung 5.29).

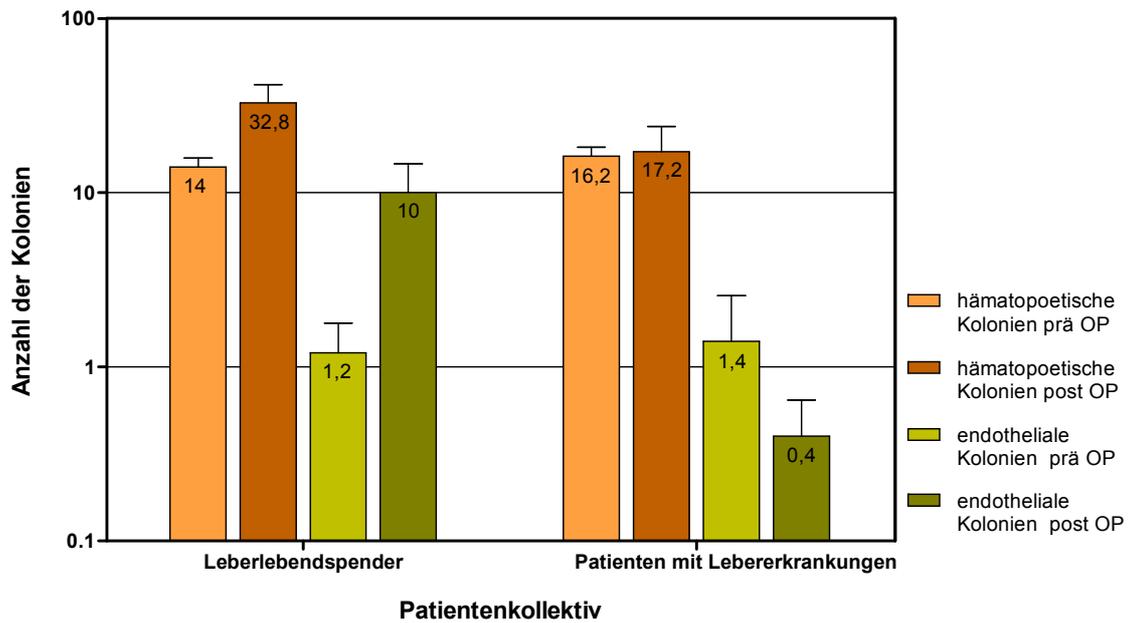


Abb. 5.29: Gesamtzahl der prä- und postoperativ gebildeten Kolonien im hämatopoetischen und endothelialen Assay vor und zwölf Stunden nach Operation, n=5. Logarithmische Darstellung der mittleren Anzahl koloniebildender Einheiten der Leberlebenspender und Patienten mit Lebererkrankungen.

6 Diskussion

Insgesamt wird die Inzidenz der Leberzirrhose in Nordeuropa und Amerika mit 250/100.000 Einwohner im Jahr angenommen [Caselmann et al. 1997]. Davon werden 50-60% durch chronischen Alkoholabusus, 20-30 % durch chronische Virushepatitiden und 10-30% durch weitere Faktoren wie die primär biliäre Zirrhose, primär sklerosierende Cholangitis, Autoimmunhepatitis, Stoffwechselerkrankungen und Anderen ausgelöst. Es gibt nur wenige Daten zur Inzidenz akuter fulminant verlaufender Lebererkrankungen, und diese sind sehr inhomogen. In den Vereinigten Staaten von Amerika beispielsweise werden 1-30 Fälle pro 100.000 Einwohner/Jahr angegeben [Bower et al. 2007, Madl 2005,].

Eine Lebertransplantation ist zurzeit die einzige kurative Therapieoption für Patienten im Endstadium chronischer Lebererkrankungen und bei fulminantem Leberversagen. In Europa bestand 2009 bei ca. 2500 Patienten der Bedarf für eine Lebertransplantation. Aber es konnten aufgrund der begrenzten Anzahl von Organen nur 1500 Lebertransplantationen durchgeführt werden, Leberlebendspenden mitgezählt [Oosterlee und Rahmel 2009].

Wegen der begrenzten Anzahl von Spenderorganen wurde die Aufmerksamkeit auf die Möglichkeit fokussiert, Lebergewebe und -funktion durch Transplantation allogener Hepatozyten oder autologer Stammzellen wiederherzustellen. Auch die Verwendung in vitro differenzierter embryonaler oder fetaler Stammzellen stellt eine alternative Möglichkeit regenerativer Therapien dar. Aber die Risiken der Abstoßung oder der Entwicklung von benignen oder malignen Keimzelltumoren sowie ethische Aspekte limitieren diese Ansätze für eine erfolgreiche und sichere Therapie.

Derzeit wird diskutiert, dass die Leberregeneration sowohl über reife Hepatozyten als auch über intrahepatische und extrahepatische Stamm- und Progenitorzellen vermittelt wird. Dabei scheinen die extrahepatischen Stammzellen im Knochenmark angesiedelt zu sein und über Zirkulation in die Leber zu gelangen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine vergleichende Analyse der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften mobilisierter Progenitorzellen im Rahmen verschiedener leberchirurgischer Eingriffe durchgeführt. Hierzu sollten drei Patientenkollektive untersucht werden: zum einen Patienten, die sich aufgrund einer Lebererkrankung einer Leberresektion unterziehen mussten (Kollektiv I), zum anderen gesunde Leberlebendspender (Kollektiv II), und weiterhin Patienten bei denen eine Leberembolisation durchgeführt wurde (Kollektiv III). Wenige Wochen nach Beginn dieser Arbeit musste jedoch auf das Kollektiv III verzichtet werden, da

Pfortaderembolisationen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf nicht mehr durchgeführt wurden. Auf eine Auswertung bereits erhobener Daten wurde aufgrund der geringen Anzahl der Patienten dieses Kollektivs somit verzichtet.

Eine weitere Schwierigkeit ergab sich bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten der Patienten des Kollektivs I sowie der Spender (Kollektiv II). Durch einen Wechsel des Durchflusszytometers kam es zu Kompensationsinkompatibilitäten, so dass lediglich Daten von sechs Patienten des Kollektiv I und Daten von einem Leberlebendspender ausgewertet werden konnten. Ferner war es aus organisatorischen Gründen nicht immer möglich, die Blutproben zu den geplanten Zeitpunkten zu erhalten, so dass die einzelnen zeitlichen Verläufe teilweise lückenhaft sind.

6.1 Durchflusszytometrische Ergebnisse

6.1.1 Mobilisierung CD133-positiver Zellen

Die durchflusszytometrischen Analysen der peripheren Blutleukozyten der sechs Patienten des Kollektivs I zeigte deutlich erhöhte Prozentzahlen zirkulierender CD133⁺ Zellen (MW $2,3 \pm 0,8$ bezogen auf die MNC) bereits vor dem operativen Eingriff. Dabei wiesen alle CD133⁺ Zellen den Panleukozytenmarker CD45 auf und entsprachen somit hämatopoetischen Zellen. Postoperativ war kein Anstieg dieser Zellpopulation zu verzeichnen. Auch bei dem Leberlebendspender fand sich bereits präoperativ ein erhöhter Wert zirkulierender CD133⁺/CD45⁺ Zellen, der jedoch postoperativ um den Faktor zwei zunahm (prä OP: 2,9%, 12h: 5,6%). Diese Beobachtungen an dem Leberlebendspender stimmen mit den Ergebnissen der Studie von Gehling et al. 2005 überein. Darin wurde gezeigt, dass es bei gesunden Leberlebendspendern im Anschluss an eine partielle Hepatektomie zu einer Mobilisierung CD133⁺/CD45⁺ Zellen kommt, und zwar auch dann, wenn bereits präoperativ eine erhöhte Anzahl zirkulierender CD133⁺/CD45⁺ Zellen feststellbar war. Es ist unklar, warum sich bei dem Leberlebendspender aus dieser Arbeit ebenfalls eine erhöhte präoperative CD133⁺ Population in selbem Ausmaß wie bei dem Patientenkollektiv I nachweisen ließ. Aber es ist bekannt, dass auch beim Gesunden Faktoren bestehen, die zu einer Erhöhung zirkulierender CD133⁺ Zellen führen. Beispielsweise kann angenommen werden, dass physisches Training ebenfalls zu einer Mobilisierung hämatopoetischer CD34⁺ oder CD133⁺ Stammzellen führen könnte [Laufs et al. 2004, Morici et al. 2005, Steiner et al.

2005]. Es kann aber durchaus von weiteren Faktoren ausgegangen werden, die zu einer Mobilisierung CD133⁺ Zellen führen können.

Bei weiterer Phänotypisierung zeigte sich die Mehrheit der zirkulierenden CD133⁺ Zellen sowohl der Patienten als auch des Spenders für den Stammzellmarker CD34 negativ und für den Monozytenmarker CD14 positiv. Diese CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Population war bei allen Patienten sowie beim Leberlebendspender ausschließlich in der monozytären Zellfraktion zu beobachten (Abbildung 5.2 B, 5.4 E). Dies spricht dafür, dass es sich bei dieser Population um myelomonozytäre Progenitorzellen handelt, wie bereits in der Studie von Gehling et al. 2005 beschrieben. Diese zirkulierenden myelomonozytären Progenitorzellen sind möglicherweise beteiligt bei der Regeneration einer durch Teilresektion geschädigten Leber bzw. an regenerativen Prozessen bei Patienten mit einer Lebererkrankung bereits vor einem operativen Eingriff. Gestützt wird diese Hypothese durch Ergebnisse einer weiteren Studie von Gehling et al., die eine CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Population im peripheren Blut von Patienten mit Leberzirrhose (n=72) nachweisen konnte [Gehling et al. 2010]. Die in der zitierten Studie identifizierten CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Progenitorzellen wiesen analog der nach partieller Hepatektomie identifizierten CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Zellen ein hepatisches Differenzierungspotential *in vitro* auf.

Das hepatozytäre Differenzierungspotential CD133⁺ Zellen *in vivo* ist bisher nur unvollständig untersucht. Im Nagermodell wurde nachgewiesen, dass CD133⁺/CD45⁺ Knochenmarkszellen zumindest zur Regeneration von hepatischem sinusoidalem Endothelgewebe beitragen können [Harb et al. 2009]. In zwei klinischen Studien am humanen Modell konnte gezeigt werden, dass die intraportale Applikation von autologen CD133⁺ Knochenmarkszellen mit anschließender Pfortaderembolisation zu einer stärkeren Hypertrophie der vermehrt perfundierten Lebersegmente führt als die alleinige Pfortaderembolisation [am Esch et al. 2005, Fürst et al. 2007]. Durch die zusätzliche Applikation von CD133⁺ Knochenmarkszellen konnte das Lebervolumen derart gesteigert werden, dass alle Patienten, die an einem malignen Tumor der Leber erkrankt waren, einer tumorresezierenden Operation zugeführt werden konnten [Fürst et al. 2007]. Die genauen Mechanismen, wie die CD133⁺ Zellen zu dieser Hypertrophie beigetragen haben, wurden allerdings in diesen Studien bzw. in anschließenden Studien nicht untersucht.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurde aktuell über die zunehmende Mobilisierung hämatopoetischer CD133⁺ Zellen bei lebererkrankten Patienten nach partieller Hepatektomie berichtet [Zocco et al. 2010], wobei die Autoren von rekrutierten Stammzellen aus dem Knochenmark ausgehen. Es müssen

verschiedene Mechanismen und Begleitfaktoren für die Mobilisierung CD133⁺ Zellen existieren, wie beispielsweise das Alter der Patienten, die Art und das Ausmaß der Erkrankungen. Diese sollten in nächster Zeit identifiziert werden, um daraufhin mögliche therapeutische Strategien entwickeln zu können. Weiterhin wurde in dieser Studie in dem resezierten erkrankten Lebergewebe CD133⁺ und AFP-positive Zellen nachgewiesen, die als mögliche hepatische Progenitorzellen betrachtet werden könnten [Zocco et al. 2010]. Von einer anderen Arbeitsgruppe wurde in dem selben Jahr über CD133⁺ Zellen berichtet, die in den Hering-Kanälen humaner Leber lokalisiert waren und in den so genannten "ductular reactions" bei gesundem und geschädigtem Lebergewebe detektiert wurden und somit als mögliche hepatische Progenitorzellen oder Leberstammzellen in Betracht kommen [Jozefczuk et al. 2010]. Dies sind vermehrt Entdeckungen im humanen Organismus und zeigen eine Beteiligung dieser CD133⁺ Zellen an. Dass die zirkulierenden CD133⁺ Zellen, vermutlich aus dem Knochenmark mobilisiert, auch die humane Leber besiedeln und mögliche Progenitoren zur Leberregeneration bilden, kann zur Zeit nicht nachgewiesen werden. Somit bleiben weitere Interaktionen zu erörtern.

Ferner wird den CD133⁺ Zellen eine weitere Rolle zugeschrieben. Es wird zunehmend über die Existenz von so genannten Karzinomstammzellen [Pardal et al. 2003, Reya et al. 2001], speziell auch Leberkarzinomstammzellen berichtet. Es gibt Hinweise für die Expression von CD133 dieser Leberkarzinomstammzellen [reviewed in Xu et al. 2009]. Tomuleasa et al. isolierte aus Biopsien von humanem hepatozellulärem Karzinomen Stammzellen mit einer Expression von CD133 [Tomuleasa et al. 2010]. Diese Stammzellen besitzen eine gewisse Resistenz gegen Derivate von Platinanaloga und Interkalantien. Aber CD133 ist nicht beschränkt auf somatische Stamm- und Tumorstammzellen, wie bereits in der Einleitung erwähnt, dieses Oberflächenprotein ist somit kein spezifischer Marker für Leberkarzinomstammzellen [reviewed in Wu und Wu 2009]. Dabei bleibt zukünftig zu bedenken, dass KM Zellen [Duffield et al. 2005] und speziell CD133⁺ Zellen zur Entstehung als auch zur Regeneration von Lebererkrankungen beitragen könnten. Wie bereits oben erwähnt, sollten vor therapeutischen Interventionen mit KM Stammzellen bzw. CD133⁺ Zellen zunächst weitere Interaktionen erforscht werden.

Interessanterweise konnte bei weiterer Phänotypisierung der CD133⁺ Zellen eine Mobilisierung CD133⁺/CXCR4⁺ Zellen nach Leberlebendspende und bei allen Patienten vor und nach Leberresektion im peripheren Blut, entsprechend des Verlaufs CD133⁺/CD14⁺ Zellen, nachgewiesen werden (Abbildung 5.3 und 5.1). Diese CD133⁺/CXCR4⁺ Zellpopulation war bei allen Patienten und beim Spender wiederholt

hauptsächlich in der monozytären Fraktion der MNC zu finden (Abbildung 5.2 E, 5.5 B). In den letzten Jahren wurden bereits zirkulierende Zellen in peripherem humanem Blut nachgewiesen, die Transkripte von muskulären, neuronalen, endothelialen und hepatischen Progenitorzellmarkern aufweisen [Ratajczak et al. 2004, Wojakowski et al. 2004]. Diese Zellen waren angereichert in CXCR4⁺, CD34⁺ und CD133⁺ Populationen der MNC aus dem KM [Ratajczak et al. 2004]. Die Rekrutierung von CXCR4⁺ Zellen findet vor allem durch die im KM ansässigen SDF-1 freisetzenden Stromazellen statt. Aber auch in weiteren Organen wurden SDF-1 freisetzende Zellen detektiert. Neben der ubiquitären Expression des SDF-1 Gens beim Menschen außer von Erythrozyten [Shirozu et al. 1995], wurde die Expression von SDF-1 unter anderem von Astrozyten bei Nagern [Bajetto et al. 1999], von humanen Endothelzellen und Dendritischen Zellen der Haut [Pablos et al. 1999], und von Epithelzellen der Gallengänge in der Leber im humanen Modell [Terada et al. 2003] und im Nagermodell [Kollet et al. 2003] beschrieben. Somit könnte SDF-1 von verletzten Gewebszellen ausgeschüttet werden, um mittels Chemotaxis CXCR4⁺ Stammzellen zur Regeneration anzulocken bzw. um eine Rekrutierung dieser Zellen in die Leber zu induzieren. Unterstützende Ergebnisse für diese Vermutungen liefert der Nachweis von hochregulierter mRNA von SDF-1 in verletztem Gewebe bei Nagern, einschließlich hypoxischem Myokard, geschädigter Niere und Leber [Ratajczak et al. 2004]. In diesem Zusammenhang lässt sich weiterhin feststellen, dass der Verlauf der CXCR4⁺ MNC und der CXCR4⁺ monozytären Zellen, dargestellt in den Abbildungen 5.19 bis 5.22, mit dem Verlauf der CD133⁺/CXCR4⁺ und CD133⁺/CD14⁺ Zellen beider Kollektive (Abb. 5.1 und 5.3) übereinstimmt. Dies könnte auf eine Beteiligung von SDF-1 an der Mobilisierung CD133⁺ Progenitorzellen hinweisen. Hatch et al. berichteten über eine Beteiligung der SDF-1/CXCR4-Achse zumindest an der Aktivierung von intrahepatischen Ovalzellen bei Nagern [Hatch et al. 2002]. In einer Studie mit Patienten, die an einer Lebererkrankung leiden, wie beispielsweise Hepatitis und Leberzirrhose, wurde ebenfalls eine wichtige Rolle des SDF-1, ausgeschüttet von Epithelzellen der Gallengänge, bei der Rekrutierung von CXCR4⁺ Lymphozyten in die geschädigte Leber vermutet [Terada et al. 2003]. In einer weiteren, aktuellen Studie konnte an Patienten mit Leberzirrhose gezeigt werden, dass die SDF-1-Plasmakonzentration mit der Anzahl zirkulierender CD133⁺/CXCR4⁺ Zellen korreliert [Gehling et al. 2010]. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass eine Leberschädigung eine Rekrutierung von CD133⁺ Progenitorzellen aus dem KM induzieren kann, und dass die rekrutierten Progenitorzellen sich in der Leber ansiedeln und an der Leberregeneration teilnehmen.

Grundsätzlich lässt sich festhalten, dass die hier untersuchten Patienten mit einer Lebererkrankung bereits präoperativ eine erhöhte Anzahl zirkulierender CD133⁺ Zellen aufwiesen, die nach erfolgtem operativem Eingriff an der Leber nicht weiter zunahm. Vielmehr war ab dem dritten postoperativen Tag ein Abfall CD133⁺/CD14⁺, CD133⁺/CXCR4⁺ und CXCR4⁺ Zellen deutlich unter das präoperative Niveau zu verzeichnen. Ein Phänomen, welches nach Leberlebenspende nicht zu beobachten war. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Leberresektion eine Sanierung der Leber herbeigeführt und somit den Anreiz für eine Rekrutierung von Progenitorzellen eliminiert hat. Die Resektion des erkrankten Lebergewebes wäre folglich als kausaler Faktor des postoperativen Abfalls der zirkulierenden Progenitorzellen anzusehen. Welche Mechanismen die präoperative Rekrutierung dieser Progenitorzellen induziert haben können, bleibt derzeit unklar. Es wäre denkbar, dass die durch die Erkrankung geschädigten Hepatozyten selbst zur Anlockung von Zellen bzw. zur Bildung eines regenerativen Milieus durch Freisetzung von Zytokinen beigetragen haben. Andererseits könnten ebenso andere intrahepatische Zellen wie Cholangiozyten, Kupferzellen oder Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, ein regeneratives Milieu zu induzieren. Alternativ könnten die CD133⁺ Zellen aktiv von Tumorzellen rekrutiert worden sein, um das Tumorwachstum zu steigern. Hinweise darauf, dass CD133⁺ Zellen das Tumorwachstum begünstigen können, liefern mehrere tierexperimentelle Studien an SCID Mäusen [Loges et al. 2004, Bruno et al. 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem eine weitere Population zirkulierender CD133⁺/CD45⁺/CD34⁻ Zellen nachgewiesen. Diese Zellen waren über die fehlende Expression von CD14 charakterisiert und waren bei allen Patienten und dem Spender nur in der lymphozytären Fraktion nachweisbar. Interessanterweise fand sich für diese Zellpopulation zwölf Stunden nach dem operativen Eingriff bei beiden Kollektiven ein Tiefpunkt, im Gegensatz zu CD133⁺/CD14⁺ Zellen. Die Bedeutung dieses Phänomens bzw. die Funktion dieser CD133⁺/CD14⁻ Zellen ist unklar. Sie könnten eine Basis von zirkulierenden unreiferen Progenitorzellen darstellen, welche unter normalen Bedingungen in geringem Level im peripheren Blut zirkulieren und einen Pool von Stammzellen in peripheren Geweben aufrechterhalten. Die Vermutung eines zirkulierenden Stammzellpools wurde bereits von anderen Gruppen geäußert [Lemoli et al. 2006, Ratajczak et al. 2004].

6.1.2 Mobilisierung CD34-positiver Zellen

Nach Leberlebenspende wurde nur eine geringe Mobilisierung einer CD34⁺/CD45⁺ Population (<1%) nachgewiesen. Nach Leberresektion mobilisierten nur zwei von sechs Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten in ebenso geringem Umfang CD34⁺ Zellen, die zum überwiegenden Teil c-kit exprimierten. Es konnte keine Beziehung zwischen dem Eingriff an der Leber und der geringen mobilisierten CD34⁺ Population bei diesen beiden Patienten festgestellt werden. Insgesamt konnte in dieser Arbeit keine signifikante Mobilisierung CD34⁺ Zellen nach Leberresektion ermittelt werden.

Die CD34⁺ Population nach Leberlebenspende war im Vergleich zum starken Anstieg der CD133⁺ Zellen zwölf Stunden nach dem Eingriff sehr gering. Bereits 2005 wurde von Di Campi et al. eine Studie zur Beteiligung CD34⁺ HSZ nach Hepatektomie durchgeführt, wobei ebenfalls keine signifikante Mobilisierung dieser Stammzellen festgestellt werden konnte. In anderen Studien wurde hingegen nach partieller Hepatektomie über eine deutliche Mobilisierung CD34⁺ HSZ im Blut von Nagetieren bzw. von Patienten bei primären und sekundären Lebertumoren berichtet [De Silvestro et al. 2004, Fujii et al. 2002, Lemoli et al. 2006]. Es gab und gibt also besonders im Menschen kontroverse Ergebnisse bezüglich der Mobilisierung der beteiligten HSZ nach operativen Eingriffen an der Leber.

6.1.3 Mobilisierung c-kit-positiver Zellen

Bei allen Patienten des Kollektivs I war präoperativ eine zirkulierende Population c-kit⁺ Zellen (2,5% ± 0,7) zu beobachten. Unerwarteterweise ließen sich diese Zellen ebenso präoperativ und sogar in auffallend hohem Maße beim Leberlebenspender (8,2%) nachweisen. Dies ist sehr überraschend, da zum einem die Kontrolle keine unspezifische Bindung zeigte (Abbildung 5.14 A) und weiterhin bisher keine c-kit⁺ Zellen im peripheren Blut bei Gesunden nachgewiesen wurden. Die Ursache hierfür bleibt ungeklärt. Wie bereits erwähnt lagen zum Untersuchungszeitpunkt keine erkennbaren beeinflussenden Faktoren vor.

Die c-kit⁺ Population nahm zwölf Stunden nach Leberresektion sowie nach Leberlebenspende signifikant zu (LR: 4,1% ± 0,9; LLS: 14,5%). c-kit spielt mit seinem Liganden SCF eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung, Differenzierung und Migration von hämatopoetischen Stammzellen [McNiece et al. 1991]. Wie einleitend erwähnt, wurde c-kit bereits auf intrahepatischen Progenitorzellen von Ratten [Crosby et al. 2001, Kwon et al. 2002] identifiziert. Dies legt eine Beteiligung dieser unreifen

Stammzellen an der regenerativen Homöostase nach einem operativen Eingriff der Leber nahe. Im Gegensatz zu der CD133⁺/CD14⁺ Zellpopulation, die sich nur in der monozytären Zellfraktion darstellte, zeigten sich c-kit⁺ Zellen in allen Fällen in der monozytären als auch in der lymphozytären Zellfraktion (Abbildung 5.11 B). Es scheint sich bei den hier nachgewiesenen c-kit⁺ Zellen um eine weitere Stammzellpopulation zu handeln, die eine Rolle im Rahmen der Leberregeneration besonders nach einem operativen Eingriff spielen könnte. Die Mobilisierung c-kit⁺ Zellen fand vermutlich unabhängig von denjenigen der CD133⁺ Zellen statt, da bei Patienten des Kollektivs I keine signifikante Korrelation zwischen diesen Zellpopulationen nachgewiesen werden konnte, und da im Gegensatz zur CD133⁺ Population ein deutlicher postoperativer Anstieg zu verzeichnen war.

Im Nagetiermodell wurde bereits über die Funktion des c-kit-Rezeptors und seinem Liganden SCF berichtet. In Mäusen zeigte sich eine erhöhte hepatische Expression von SCF und c-kit nach induziertem Leberversagen mittels Acetaminophen (APAP: Paracetamol). Exogen verabreichter SCF reduzierte die Mortalität von APAP behandelten Mäusen, und erhöhte die Proliferation von Hepatozyten [Hu und Colletti 2008]. In einer anderen Untersuchung trägt SCF nach partieller Hepatektomie in Mäusen entscheidend zur hepatischen Proliferation bei: In SCF-defizienten Mäusen war die hepatische Proliferation nach partieller Hepatektomie blockiert, jedoch sobald SCF verabreicht wurde, war die Proliferation wiederhergestellt [Ren et al. 2003]. Im humanen System ist bisher kaum etwas über die Funktion von c-kit und seinem Liganden SCF in Bezug zur Regeneration der Leber bekannt. In der unter Kapitel 6.1.1 erwähnten Untersuchung von Gehling et al. an Patienten mit Leberzirrhose wurden ebenfalls zirkulierende c-kit⁺ Zellen entdeckt [Gehling et al. 2010]. Dies führt zu der Annahme, dass eine Beteiligung c-kit⁺ Progenitorzellen an der Regeneration einer geschädigten Leber möglich ist. c-kit wird auch als Marker für humane endotheliale Progenitorzellen (EPC) diskutiert [Peichev et al. 2000, reviewed in Rafii und Lyden 2003]. Diese EPC spielen eine Rolle bei der Revaskularisierung geschädigter Organe, wie beispielsweise der Retina bei Nagern [Grant et al. 2002]. In einer weiteren Studie an Nagetieren zeigte sich eine Rekrutierung c-kit⁺ Zellen aus dem KM nach Myokardinfarkt [Fazel et al. 2006]. Diese c-kit⁺ Zellen induzierten ein proangiogenes Milieu in der infarzierten Grenzzone. In einer Arbeit am humanen Modell wurde von Wojakowski et al. die Mobilisation von HSZ nach einem Myokardinfarkt und bei stabiler Angina pectoris im Vergleich zu gesunden Probanden untersucht. Dabei wurde ein signifikanter Anstieg c-kit⁺ Zellen im peripheren Blut bei Patienten nach Myokardinfarkt nachgewiesen, nicht jedoch bei stabiler Angina pectoris [Wojakowski et al. 2004]. Nach diesen Ergebnissen scheinen c-kit⁺ Zellen eine wichtige Rolle nach ischämischer

Organschädigung zu spielen. Möglicherweise ist eine Hypoxie im Organgewebe als auslösender Faktor zur Mobilisierung der EPC bzw. c-kit⁺ Zellen ursächlich. Es kann vermutet werden, dass sich c-kit⁺ EPC an der regenerativen Homöostase der Leber von unseren untersuchten Patienten nach einem operativen Eingriff beteiligen.

Die geringe Koexpression von CD34⁺ an der gesamten mobilisierten c-kit⁺ Population in allen Fällen deutet auf eine untergeordnete Rolle der CD34⁺/c-kit⁺ Population hin. Die Expression von CD34 ist auf unreifen hämatopoetischen Stammzellen am stärksten und nimmt ab, je weiter sich diese Zellen differenzieren. Es ist also anzunehmen, dass es sich bei den zirkulierenden c-kit⁺ Zellen überwiegend um bereits determinierte, möglicherweise hepatische Progenitorzellen handelt. Diese Interpretation wird unterstützt durch die Ergebnisse einer Studie von Li et al. Es konnte gezeigt werden, dass c-kit, nicht jedoch CD34 auf expandierten murinen Leberprogenitorzellen exprimiert wird [Li et al. 2006].

Interessanterweise zeigte sich in der vorliegenden Arbeit in allen Fällen ein deutlicher Teil der c-kit⁺ Zellen für CXCR4 positiv. Besonders nach Leberresektion nahm dieser Anteil stark zu (prä OP: 44%, 12h: 78% gemessen an der c-kit⁺ Population). Dabei zeigten sich die c-kit⁺/CXCR4⁺ Zellen in beiden Kollektiven zum überwiegenden Teil in der monozytären Zellfraktion (Abbildung 5.11 C, 5.14 B). Dies lässt annehmen, dass sich vor allem monozytäre c-kit⁺ Zellen, zusätzlich zur CD133⁺/CD14⁺ Population, an der Regeneration einer geschädigten Leber durch die CXCR4-SDF-1 Achse mitbeteiligen könnten.

6.1.4 Mobilisierung bcrp-1-positiver Zellen

Die Anzahl bcrp-1⁺ zirkulierender Zellen zeigte postoperativ sowohl im Kollektiv I als auch im Kollektiv II keine signifikanten Anstiege. Vielmehr war im Kollektiv I eine Normalisierung von leicht erhöhten präoperativen Werten zu verzeichnen. Bei vier Patienten mit einer Lebererkrankung präsentierten sich vor allem präoperativ die nachgewiesenen kleinen bcrp-1⁺ Populationen im Bereich von einem Prozent.

Interessanterweise wurde in einer aktuellen Studie bcrp-1 u.a. als Marker für humane intrahepatische Progenitorzellen angesehen [Spee et al. 2010]. In der hier vorliegenden Arbeit scheinen aber zumindest die zirkulierenden bcrp-1⁺ Zellen, im Vergleich zu den mobilisierten CD133⁺ Zellen und c-kit⁺ Zellen, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Es zeigte sich in dieser Arbeit keine Assoziation zwischen der Mobilisierung bcrp-1⁺ Zellen und dem operativen Eingriff.

6.1.5 Mobilisierung CD14-positiver Zellen

Im postoperativen Verlauf nach Leberlebendspende fand sich ein deutlicher Anstieg CD14⁺ Zellen in der MNC (prä OP: 17%, 24h: 44%). Dieser beruhte auf einer vermehrten Expression dieses Markers nur innerhalb der monozytären Zellfraktion. Die Anzahl der CD14⁺ Zellen innerhalb der Monozytenpopulation nahm dabei von 79% präoperativ auf 90% 24 Stunden postoperativ zu. Bei den Patienten des Kollektivs I lag der prozentuale Anteil CD14⁺ Zellen innerhalb der monozytären Fraktion im zeitlichen Verlauf stets über 90%. Im Kollektiv I war im Vergleich zum Leberlebendspender die Anzahl zirkulierender CD14⁺ Zellen bereits präoperativ um das zweifache erhöht (34% SEM \pm 7,1), bezogen auf die MNC. Zwölf Stunden nach Leberresektion war nur ein leichter Anstieg CD14⁺ Zellen feststellbar. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass sowohl bei den Patienten des Kollektiv I als auch beim Spender postoperativ, zusätzlich zu der Mobilisierung CD133⁺/CD14⁺ Progenitorzellen, eine Mobilisierung reifzelliger CD14⁺ Monozyten zu verzeichnen war. Diese Beobachtungen weisen daraufhin, dass reife zirkulierende CD14⁺ Monozyten neben der Schutzfunktion gegen Pathogene ebenfalls an der Regeneration einer Leber, die durch endogene oder exogene Einflüsse geschädigt wurde, involviert sein könnten. Aus Studien geht hervor, dass eine Subpopulation humaner reifer CD14⁺ Monozyten in der Lage ist, sich in Hepatozyten zu differenzieren [Ruhnke et al. 2005, Zhao et al. 2003]. Und es gibt noch weitere Ergebnisse, aus denen sogar eine Multipotenz CD14⁺ Monozyten abgeleitet werden kann. Es wurde 2007 von Seta et al. über diese Multipotenz humaner CD14⁺ Zellen berichtet. Diese Zellen, monocyte-derived multipotential cells (MOMC) genannt, zeigten sich unter anderem positiv für CD14, CD45 und Typ I Kollagen und enthielten Progenitoren mit der Fähigkeit in verschiedene Gewebetypen zu differenzieren, einschließlich Knochen, Knorpel, Fettgewebe, kardiales Muskelgewebe und neuronales Gewebe [Seta et al. 2007]. Zusätzlich gibt es Arbeiten aus denen hervorgeht, dass humane CD14⁺ Monozyten in vitro ein endotheliales Differenzierungspotential besitzen [Fernandez Pujol et al. 2000 und 2001, Schmeisser et al. 2001, Seta et al. 2007]. Möglicherweise sind die in dieser Arbeit nachgewiesenen reifen CD14⁺ Monozyten, neben den CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ Zellen, ebenfalls in der Lage, sich zu Hepatozyten und/oder anderen Zellen beispielsweise Endothelzellen der Leber zu differenzieren bzw. durch Fusion zu generieren. Es ist jedenfalls auffallend, dass CD14 in der Leber nicht nur von Kupfferzellen [Tomita et al. 1994, Dai et al. 2003], sondern ebenfalls von sinusoidalen Endothelzellen [Scoazec und Feldmann 1991] und reifen Hepatozyten [Hayashi et al. 2006, Liu et al. 2002] exprimiert wird.

6.2 Vergleich des koloniebildenden Potentials

Nach Leberlebendspende im Kollektiv II, nicht jedoch nach Leberresektion im Kollektiv I, war eine deutliche Zunahme des koloniebildenden Potentials der zirkulierenden Leukozytenpopulationen feststellbar. Mittels hämatopoetischem Assay konnte nach Leberlebendspende eine starke Zunahme der CFU-M (um Faktor 5,9) und eine Abnahme der CFU-G (um Faktor 0.7) demonstriert werden, während sich die Anzahl generierter CFU-GM und GEMM nur geringfügig änderte. Kolonien des Typs CFU-M enthalten vor allem Monozytoblasten. Dies lässt auf eine postoperative Zunahme monozytärer Progenitorzellen schließen. In Zusammenschau mit dem Nachweis signifikant erhöhter zirkulierender CD14⁺ Monozyten und CD133⁺/CD14⁺ Progenitorzellen zwölf Stunden nach Leberlebendspende kann hypothetisiert werden, dass es sich bei den mobilisierten Zellen insbesondere um myelomonozytäre Progenitorzellen mit möglichem leberregeneratorischen Potential handelt. Diese Annahme wird durch Studien von Gehling et al. unterstützt, in denen eine Mobilisierung von CD133⁺ myelomonozytären Progenitorzellen nach Leberleberspende sowie bei Patienten mit Leberzirrhose beobachtet wurde [Gehling et al. 2005 und 2010].

Auch im endothelialen Ansatz zeigte sich nach Leberlebendspende eine deutliche Zunahme des koloniebildenden Potentials der peripheren Blutzellen. Die Morphologie der in diesem Assay generierten Kolonien weist darauf hin, dass diese Kolonien ebenfalls von monozytären Progenitoren gebildet werden könnten. Die stärkste Zunahme ließ sich für CFU-M-like Kolonien (um Faktor 43) beobachten, wobei dies auch gleichzeitig die stärkste Zunahme gemessen an allen im hämatopoetischen sowie endothelialen Assay generierter CFUs nach Leberlebendspende darstellte. In der Peripherie der CFU-M-like Kolonien fanden sich Zellen, die der Morphologie reifer Endothelzellen entsprechen (Abb. 5.28 C). Klassische CFU-EC, welche bekanntermaßen die Fähigkeit besitzen Endothelzellen zu generieren [Gehling et al. 2000], waren hingegen postoperativ nicht nachweisbar. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass es sich bei den mobilisierten CD133⁺ Zellen vornehmlich um monozytäre Progenitorzellen handelt, die möglicherweise auch an der im Rahmen der Leberregeneration stattfindenden Blutgefäßneubildung beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob die Anzahl der im endothelialen Assay generierten Kolonien mit der Anzahl der zirkulierenden CD133⁺ Zellen korreliert. Dies war jedoch aufgrund der aus o.g. Gründen begrenzten Menge auswertbarer durchflusszytometrisch erhobener Daten nicht möglich. Die Hypothese, dass zirkulierende CD133⁺ Progenitorzellen, besonders CD133⁺/CD14⁺ Zellen, im

Rahmen der Leberregeneration an der Blutgefäßneubildung beteiligt sind, wird durch zahlreiche Beobachtungen unterstützt. Wie bereits erwähnt konnte zum einen gezeigt werden, dass CD14⁺ Monozyten die Kapazität besitzen, in vitro zu Hepatozyten [Zhao et al. 2003] als auch zu Endothelzellen zu differenzieren [Fernandez Pujol et al. 2000, Harraz et al. 2001, Schmeisser et al. 2001, Zhao et al. 2003]. Ferner wurde nachgewiesen, dass der monozytäre Marker CD14 auf humanen Endothelzellen exprimiert wird [Jersmann et al. 2001]. Zeitgleich ist es bei zwei Arbeitsgruppen gelungen, Endothelprogenitorzellen in der Population adulter humaner CD133⁺ Zellen nachzuweisen [Gehling et al. 2000, Peichev et al. 2000]. In Zusammenschau dieser beiden Studien kann geschlossen werden, dass adulte humane CD133⁺ Zellen im Knochenmark lokalisiert sind und durch Wachstumsfaktoren wie beispielsweise G-CSF in das periphere Blut mobilisiert werden können. Bezüglich einer Beteiligung von Knochenmarkzellen an der Leberregeneration haben tierexperimentelle Studien gezeigt, dass sowohl unaufgereinigte Knochenmarkszellen als auch hochaufgereinigte CD133⁺ Knochenmarkszellen nach partieller Hepatektomie beziehungsweise nach einer toxischen Leberschädigung an der Rekonstitution der sinusoidalen Endothelzellen beteiligt sind [Fujii et al. 2002, Harb et al. 2009]. Genauer betrachtet konnte die Arbeitsgruppe von Fujii et al. am Mausmodell zeigen, dass KM Zellen nach einer Hepatektomie in die Leber einwanderten und sich an der Regeneration beteiligten. Die mit einem grünen fluoreszierenden Farbstoff markierten KM Zellen wurden in der Umgebung der hepatischen sinusoidal Räume nachgewiesen. Es stellte sich heraus, dass es sich bei diesen Zellen zu 70% um sinusoidale Endothelzellen und zu 28 % um Kupferzellen handelte [Fujii et al. 2002]. Dies war die erste Studie, die eine direkte Involvierung der KM Zellen bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zeigte.

Im Kollektiv I ließ sich postoperativ keine Zunahme des koloniebildenden Potentials der zirkulierenden Leukozytenpopulationen feststellen. Vergleicht man dieses Ergebnis nach Leberresektion mit dem zeitlichen Verlauf der durchflusszytometrisch erfassten zirkulierenden CD133⁺ Zellen im peripheren Blut, so lässt sich ein Zusammenhang zwischen dem koloniebildenden Potential und den zeitlichen Verlauf dieser Progenitorzellen vermuten. Genauso wie sich durchflusszytometrisch kein Anstieg der CD133⁺ Zellen nachweisen ließ, fehlt der postoperative Anstieg koloniebildender Einheiten im Colony Assay. Dies lässt sich als weiteres Indiz für den Zusammenhang zwischen mobilisierten CD133⁺ Zellen und der damit verbundenen Fähigkeit für die Bildung von myelomonozytären Kolonien werten. Aber weiterführende Untersuchungen sind hier notwendig, um diese Hypothese zu untermauern.

Im endothelialen Assay zeigte sich sogar eine Abnahme der CFU-M-like Kolonien im Kollektiv I, entsprechend der Verläufe der zirkulierenden der CD133⁺/CD14⁺ und CD133⁺/CXCR4⁺ Zellen. Auch diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass es sich bei den zirkulierenden CD133⁺/CD14⁺ und CD133⁺/CXCR4⁺ Zellen um monozytäre Progenitoren mit endotheliale Potential handelt. Für diese Hypothese sprechen auch Ergebnisse aus weiteren Studien an Tiermodellen, in denen bereits über die Beteiligung zirkulierender CD133⁺ Endothelprogenitorzellen an der Neoangiogenese nach Gewebeschämie und an der Regeneration des geschädigten Organs berichtet wurde [Gill et al. 2001, Kocher et al. 2001]. Außerdem wiesen Peichev et al. die Koexpression von CXCR4 auf zirkulierenden CD133⁺ Endothelprogenitoren nach und demonstrierten die Migration dieser Zellen zu einem SDF-1 Gradienten in vitro [Peichev et al. 2000]. Gestützt werden diese Ergebnisse durch Berichte über proliferierende und migrierende Endothelprogenitorzellen aus dem KM zum Teil der vaskulären Verletzung nach einer Hepatektomie in Mäusen [Asahara und Takahashi et al. 1999, Martinez-Hernandez et al. 1995]. Überdies wurde die Involvierung KM abstammender endothelialer Progenitorzellen an der Vaskulogenese in Tumoren beschrieben [Arbab et al. 2006, Dome et al. 2006, reviewed in Ergün et al. 2007, Hilbe et al. 2004, reviewed in Ribatti 2004, Shirakawa et al. 2002]. Beispielsweise waren mobilisierte Endothelprogenitorzellen im peripheren Blut von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht. Dabei zeigten sich CD133⁺ Mikrogefäße in höchster Konzentration im angrenzenden Tumorgewebe, im Vergleich zum Tumorgewebe, tumorfremem Gewebe und gesunden Kontrollen [Yu et al. 2007]. Die Grenzzone ist der Ort des Tumorwachstums und geht mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einher. Folglich könnten CD133⁺ endotheliale Progenitorzellen auch im Menschen sowohl an der Wundheilung nach operativen Eingriffen an der Leber als auch an der Angiogenese und Neovaskulogenese während eines Tumorwachstums teilnehmen.

Zusammengefasst weisen beide Kollektive einen deutlichen Unterschied bezüglich der Mobilisierungsverläufe und koloniebildendem Potential auf. Während im Kollektiv I durch bestehende Lebererkrankungen bereits präoperativ eine Mobilisierung von Progenitorzellen zu verzeichnen und diese postoperativ eher rückläufig war, konnte bei gesunden Leberspendern eine deutliche Rekrutierung der Progenitorzellen nach dem operativen Eingriff beobachtet werden. Die im Kollektiv II beobachteten mobilisierten CD133⁺ Progenitorzellen könnten im Anschluss an einen leberchirurgischen Eingriff im Sinne von beispielsweise hepatozytären Progenitorzellen an der Leberregeneration

beteiligt sein, wie auch bereits von anderen Gruppen vermutet wurde [Gehling et al. 2005, Gehling et al. 2010, am Esch et al. 2005].

Überraschend war der präoperative Nachweis von CFU-EC-like Kolonien in beiden Kollektiven, wobei die Anzahl dieser CFUs in Kollektiv I mehr als doppelt so hoch war. Es handelt sich bei diesen Kolonien um CFUs, die eine Morphologie aufweisen, wie sie für klassische CFU-EC im endothelialen Assay beschrieben ist, die jedoch im hämatopoetischen Assay zu beobachten sind. Über die biologischen Eigenschaften dieser CFUs ist derzeit nichts bekannt.

Interessanterweise wurde weder prä- noch postoperativ die Bildung von BFU-E beobachtet. Andererseits kam es im Anschluss an eine Leberspende zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl generierter CFU-E (um den Faktor 2,8). BFU-E sind die unreifsten erythrozytären Progenitorzellen, die im verwendeten Colony Assay nachweisbar sind. Die Differenzierung von BFU-E in CFU-E wird vor allem durch SCF induziert [Broudy et al. 1997], und die Funktion von CFU-E ist im Wesentlichen abhängig von Erythropoetin und SCF [reviewed in Munugalavadla und Kapur 2005, Wu et al. 1997]. Dies lässt auf einen Zusammenhang zwischen der Bildung von CFU-E und der mobilisierten c-kit⁺ Population schließen. Die vermehrte postoperative Mobilisierung c-kit⁺ Zellen nach Leberlebenspende könnte also mit der erhöhten postoperativen CFU-E Bildung in Zusammenhang stehen bzw. diese bedingen. Da die Population CD133⁺ Progenitorzellen vornehmlich myelomonozytäre, und weniger erythrozytäre Progenitorzellen umfasst [Yin et al. 1997, Freund et al. 2006], dürfte die vermehrte Bildung von CFU-E eher auf eine CD133-negative Population zurückzuführen sein.

Im Kollektiv I ließ sich postoperativ nur eine geringe Zunahme der Anzahl generierter CFU-E (im Mittel um den Faktor 1,2) nachweisen. Hierbei beruhte dieser leichte postoperative Anstieg auf der verstärkten Koloniebildung von nur einem Patienten. Werden die Daten ohne diesen Patienten betrachtet, so lässt sich eine Abnahme um den Faktor 0,7 feststellen (n=4). Dieses Ergebnis lässt sich allerdings nicht mit der erhöhten mobilisierten c-kit⁺ Population nach Leberresektion in Übereinstimmung bringen. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Bildung erythrozytärer Kolonien vor allem durch Erythropoetin induziert wird. Zusammen mit Erythropoetin führten Glucocorticoide besonders bei Hypoxie oder in anderen Stress assoziierten Situationen zu einer vermehrten Bildung von murinen Erythroblasten in vitro [Bauer et al. 1999, Dolznig et al. 2006]. Die operative Entfernung von mehreren Lebersegmenten führt möglicherweise zu einer intrahepatischen Hypoxie beziehungsweise Stresssituation,

die dann eine vermehrte Freisetzung von endothelialen Progenitoren aus dem Knochenmark induziert. Es wäre denkbar, dass diese Mechanismen durch eine Erkrankung der Leber beeinträchtigt werden, so dass im Anschluss an eine Resektion der erkrankten Lebersegmente keine signifikante Mobilisierung von erythrozytären Progenitorzellen stattfinden kann.

Betrachtet man vergleichend die Gesamtzahl der im hämatopoetischen und endothelialen Assay generierten Colony-forming units in beiden Kollektiven, so lässt sich nach Leberlebenspende, nicht jedoch im Kollektiv I, eine eindeutige Mobilisierung von sowohl hämatopoetischen als auch endothelialen Progenitorzellen feststellen (Abbildung 5.29). Analog findet sich nach Leberlebenspende eine deutliche Mobilisierung von CD133⁺ Progenitorzellen, die bei den Patienten des Kollektivs I nicht nachweisbar ist. Eine weitere Möglichkeit der differenten Ergebnisse ist der Altersunterschied innerhalb der beiden Kollektive. Das Durchschnittsalter der Leberlebenspender betrug 39,4 Jahre, während es im Patientenkollektiv bei 54 Jahren lag. Es ist bekannt, dass die Anzahl der Stamm- und Progenitorzellen mit zunehmenden Alter abnimmt [Rossi et al. 2008]. In der bereits erwähnten Studie an Patienten mit Leberzirrhose konnte gezeigt werden, dass auch die Anzahl mobilisierter CD133⁺ Progenitorzellen mit dem Alter der Patienten invers korrelierte [Gehling et al. 2010]. Die Beobachtung, dass die Anzahl der präoperativ nachgewiesenen Kolonien im Kollektiv I sogar geringfügig höher war als im Kollektiv II, spricht jedoch dafür, dass zusätzlich altersunabhängige Faktoren für die unterschiedlichen postoperativen Mobilisierungsverläufe in beiden Kollektiven verantwortlich sind.

6.3 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass zirkulierende CD34⁺ Stammzellen an der Regeneration der Leber nach einem operativen Eingriff eine untergeordnete Rolle bei Patienten nach Leberresektion spielen. Vielmehr scheinen in das periphere Blut mobilisierte CD133⁺ und c-kit⁺ Progenitorzellen in diesem untersuchten Kollektiv eine entscheidende Rolle zu spielen.

Es handelt sich bei den hier nachgewiesenen CD133⁺/CD45⁺ Zellen offenbar weniger um Stammzellen als vielmehr um oligopotente oder determinierte Progenitorzellen, wobei die Koexpression des Monozytenmarkers CD14 und des Chemokin-Rezeptors CXCR4 eine wichtige Rolle spielt. Diese CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺ und CD133⁺/CXCR4⁺

Progenitorzellen beteiligen sich möglicherweise an der Regeneration bei endogenen Lebererkrankungen und bei Gesunden nach einer Operation an der Leber. Darüber hinaus scheinen CD14⁺ Monozyten bei diesen regenerativen Prozessen involviert zu sein. Die Bildung von CFU-M und CFU-M-like Kolonien im Colony Assay liefert dafür unterstützende Beweise. Es besteht die Möglichkeit, dass Populationen von den hier nachgewiesenen CD133⁺/CD45⁺, CD133⁺/CD45⁺/CD14⁺, CD133⁺/CXCR4⁺ und auch CD14⁺ Zellen ein myelomonozytäres, womöglich sogar ein hepatisches oder endotheliales Differenzierungspotential besitzen könnten. Bei der Anlockung der mobilisierten Stamm- bzw. Progenitorzellen in die geschädigten Leberbereiche ist die SDF-1-CXCR4 Achse von möglicher relevanter Bedeutung. Die Rekrutierung von hämatopoetischen Progenitorzellen aus dem Knochenmark in die Leber könnte unter anderem durch einen erhöhten SDF-1 Spiegel im Plasma und der Leber erfolgen.

Es kann geschlussfolgert werden, dass der Nachweis von CD133⁺/CD14⁺, CD14⁺ und dem vorherrschendem Auftreten CFU-M und CFU-M-like Kolonien mit fibrozytärer Morphologie eine Beteiligung von endothelialen Progenitoren sehr wahrscheinlich macht.

Weiterhin gibt der Nachweis c-kit⁺ Zellen und die hohe Bildung von CFU-E im Colony Assay Grund zur Annahme, dass die c-kit⁺ Zellen ein erythrozytäres Differenzierungspotential besitzen und die Rekrutierung hämatopoetischer Stammzellen unter anderem durch eine intrahepatische Hypoxie gesteuert werden könnte.

Zusammengefasst geben die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate Hinweise darauf, dass die Rekrutierung von Stammzellen in das periphere Blut einen relevanten physiologischen Prozess im Falle von endogener sowie exogener Schädigung der Leber darstellt, und unterstreichen die potentielle Rolle von KM abstammenden Zellen für die Therapie von Lebererkrankungen. Bei allen Ergebnissen in dieser Arbeit darf aber nicht vergessen werden, dass es sich um ein kleines Untersuchungskollektiv handelt. Weitere umfangreichere Arbeiten sind nötig, um diese Ergebnisse zu reproduzieren und zu untermauern.

In der Zukunft muss die Rolle von hepatischen Stamm- und Progenitorzellen, als Antwort auf eine Leberverletzung und in der normalen Regeneration der Leber weiter beleuchtet werden und es müssen die zugrunde liegenden molekularen Wege und Begleitfaktoren identifiziert werden. Mit künftigen Fortschritt in der Stammzellbiologie könnten hepatische Stamm- und Progenitorzellen ein relevantes Potential für die Therapie von Erkrankungen der Leber bereitstellen.

7 **Literaturverzeichnis**

- Abe R, Donnelly SC, Peng T, Bucala R, Metz CN. Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *Journal of immunology (Baltimore)*, 2001 Jun 15;166(12):7556-6. PMID: 11390511
- Alison M, Golding M, Lalani EN, Nagy P, Thorgeirsson S, Sarraf C. Wholesale hepatocytic differentiation in the rat from ductular oval cells, the progeny of biliary stem cells. *Journal of hepatology*, 1997 Feb; 26(2):343-52. PMID: 9059956
- Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, Wright NA. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 2000 Jul 20;406(6793):257. PMID: 10917519
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 2003 Oct 30; 425(6961):968-73. Epub 2003 Oct 12. PMID: 14555960
- am Esch JS 2nd, Knoefel WT, Klein M, Ghodsizad A, Fuerst G, Poll LW, Piechaczek C, Burchardt ER, Feifel N, Stoldt V, Stockschläder M, Stoecklein N, Tustas RY, Eisenberger CF, Peiper M, Häussinger D, Hosch SB. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2005 Apr; 23(4):463-70. PMID: 15790766
- André C, d'Auriol L, Lacombe C, Gisselbrecht S, Galibert F. c-kit mRNA expression in human and murine hematopoietic cell lines. *Oncogene*, 1989 Aug;4(8):1047-9. PMID: 2474784
- Arbab AS, Pandit SD, Anderson SA, Yocum GT, Bur M, Frenkel V, Khuu HM, Read EJ, Frank JA. Magnetic resonance imaging and confocal microscopy studies of magnetically labeled endothelial progenitor cells trafficking to sites of tumor angiogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2006 Mar; 24(3):671-8. Epub 2005 Sep 22. PMID: 16179427
- Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *The EMBO journal*, 1999 Jul 15;18(14):3964-72. PMID: 10406801

- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Piccioli P, Costa A, Florio T, Schettini G. Glial and neuronal cells express functional chemokine receptor CXCR4 and its natural Ligand stromal cell-derived factor 1. *Journal of neurochemistry*, 1999 Dec;73(6):2348-57. PMID: 10582593
- Barnes DW, Loutit JF. Haemopoietic stem cells in the peripheral blood. *Lancet* 1967 Nov 25;2(7526): 1138-41. PMID: 4168569
- Bas S, Gauthier BR, Spenato U, Stingelin S, Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 2004 Apr 1;172(7):4470-9. PMID: 15034063
- Bauer A, Tronche F, Wessely O, Kellendonk C, Reichardt HM, Steinlein P, Schütz G, Beug H. The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes & development*, 1999 Nov 15;13(22):2996-3002. PMID: 10580006
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 1999; 283: 534–537. PMID: 9915700
- Bleul CC, Farzan M, Choa H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, Springer TA. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature*, 1996 Aug 29;382(6594):829-33. PMID: 8752280
- Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine*, 1996 Sep 1;184(3):1101-9. PMID: 9064327
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *Journal of the National Cancer Institute*, 2000 Aug 16;92(16):1295302. PMID: 10944550
- Bower WA, Johns M, Margolis HS, Williams IT, Bell BP. Population-based surveillance for acute liver failure. *The American journal of gastroenterology*, 2007 Nov;102(11):2459-63. PMID: 17608778
- Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood*, 1997 Aug 15;90(4):1345-64. PMID: 9269751
- Bruno S, Bussolati B, Grange C, Collino F, Graziano ME, Ferrando U, Camussi G. CD133+ renal progenitor cells contribute to tumor angiogenesis. *The American journal of pathology*, 2006 Dec;169(6):2223-35. PMID: 17148683

-
- Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 1994 Nov;1(1):71-81. PMID: 8790603
- Bunting KD. ABC transporters as phenotypic markers and functional regulators of stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2002;20(1):11-20. PMID: 11796918
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *The American journal of pathology*, 2005 Feb;166(2):545-55. PMID: 15681837
- Camargo FD, Finegold M, Goodell MA. Hematopoietic myelomonocytic cells are the major source of hepatocyte fusion partners. *The Journal of clinical investigation*, 2004 May;113(9):1266-70. PMID: 1512401
- Cantz T, Manns MP, Ott M. Stem cells in liver regeneration and therapy. *Cell and tissue research*, 2008 Jan;331(1):271-82. Epub 2007 Sep 28. PMID: 17901986
- Caselmann WH, Spengler U, Fischer HP, Sauerbruch T. Leberzirrhosen als Präkanzerosen. *Internist, Berlin* 1997;38:928-936.
- Civin CI, Mirro J, Banquerigo ML. My-1, new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody. *Blood*, 1981 May;57(5):842-5. PMID: 6163493
- Corbeil D, Röper K, Fargeas CA, Joester A, Huttner WB. Prominin: a story of cholesterol, plasma membrane protrusions and human pathology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 2001 Feb;2(2):82-91. PMID: 11247306
- Crosby HA, Hubscher S, Fabris L, Joplin R, Sell S, Kelly D, Strain AJ. Immunolocalization of putative human liver progenitor cells in livers from patients with end-stage primary biliary cirrhosis and sclerosing cholangitis using the monoclonal antibody OV-6. *The American journal of pathology*, 1998 Mar;152(3):771-9. PMID: 9502419
- Crosby HA, Kelly DA, Strain AJ. Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium. *Gastroenterology*, 2001 Feb;120(2):534-44. PMID 11159894
- Dai LL, Gong JP, Zuo GQ, Wu CX, Shi YJ, Li XH, Peng Y, Deng W, Li SW, Liu CA. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease. *World journal of gastroenterology*, 2003 Mar;9(3):622-6. PMID: 12632533

- De Silvestro G, Vicarioto M, Donadel C, Menegazzo M, Marson P, Corsini A. Mobilization of peripheral blood hematopoietic stem cells following liver resection surgery. *Hepatogastroenterology*, 2004 May-Jun;51(57):805-10. PMID: 15143921
- Deeley RG, Westlake C, Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological reviews*, 2006 Jul;86(3):849-99. PMID: 16816140
- Dell'Agnola C, Rabascio C, Mancuso P, Capillo M, Pruneri G, Gobbi A, Minucci S, Ronzoni S, Volorio S, Calabrese L, Tradati N, Martinelli G, Shultz L, Bertolini F. In vitro and in vivo hematopoietic potential of human stem cells residing in muscle tissue. *Experimental hematology*, 2002 Aug;30(8):905-14. PMID: 12160842
- Demetris AJ, Seaberg EC, Wennerberg A, Ionellie J, Michalopoulos G. Ductular reaction after submassive necrosis in humans. Special emphasis on analysis of ductular hepatocytes. *The American journal of pathology*, 1996 Aug;149(2):439-48. PMID: 8701983
- Di Campli C, Piscaglia AC, Giuliani F, Rutella S, Bonanno G, Zocco MA, Ardito F, Nuzzo G, Mancuso S, Leone G, Gasbarrini G, Pola P, Gasbarrini A. No evidence of hematopoietic stem cell mobilization in patients submitted to hepatectomy or in patients with acute on chronic liver failure. *Transplantation proceedings*, 2005 Jul-Aug;37(6):2563-6. PMID: 16182744
- Diestra JE, Scheffer GL, Català I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germà-Lluch JR, Izquierdo MA. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BRCP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. *The Journal of pathology*, 2002 Oct;198(2):213-9. PMID: 12237881
- Dolzign H, Grebien F, Deiner EM, Stangl K, Kolbus A, Habermann B, Kerényi MA, Kieslinger M, Moriggl R, Beug H, Müllner EW. Erythroid progenitor renewal versus differentiation: genetic evidence for cell autonomous, essential functions of EpoR, Stat5 and the GR. *Oncogene*, 2006 May 11;25(20):2890-900. PMID: 16407844
- Dome B, Timar J, Dobos J, Meszaros L, Raso E, Paku S, Kenessey I, Ostoros G, Magyar M, Ladanyi A, Bogos K, Tovari J. Identification and clinical significance of circulating endothelial progenitor cells in human non-small cell lung cancer. *Cancer research*, 2006 Jul 15;66(14):7341-7. PMID: 16849585

- Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *Journal of clinical investigation*, 2005 Jan;115(1):56-65. PMID: 15630444
- Durieux JJ, Vita N, Popescu O, Guette F, Calzada-Wack J, Munker R, Schmidt RE, Lupker J, Ferrera P, Ziegler-Heitbrock HW, et al. The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes. *European journal of immunology*, 1994 Sep;24(9):2006-12. PMID: 7522157
- Dutt P, Wang JF, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1 alpha and stem cell factor/kit ligand share signaling pathways in hematopoietic progenitors: a potential mechanism for cooperative induction of chemotaxis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1998 Oct 1;161(7):3652-8. PMID: 9759889
- Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1997 Apr 15;94(8):4080-5. PMID: 9108108
- Engelhardt M, Deschler B, Müller C I, Lübbert M. Plastizität adulter Stammzellen: Wunschtraum oder Realität? *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100 (49): A-3236 / B-2691 / C-2514
- Ergün S, Tilki D, Hohn HP, Gehling U, Kilic N. Potential implications of vascular wall resident endothelial progenitor cells. *Thrombosis and haemostasis* 2007 Nov;98(5):930-9. PMID: 18000595
- Evarts RP, Hu Z, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and fibroblast growth factor on early proliferation. *Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer research*, 1993 Jul;4(7):555-61. PMID: 7691152
- Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis*, 1987 Nov;8(11):1737-40. PMID: 3664968
- Fausto N, Campbell JS. The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mechanisms of development*, 2003 Jan;120(1):117-30. PMID: 12490302

- Fazel S, Cimini M, Chen L, Li S, Angoulvant D, Fedak P, Verma S, Weisel RD, Keating A, Li RK. Cardioprotective c-kit⁺ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *The Journal of clinical investigation*, 2006 Jul;116(7):1865-77. PMID: 16823487
- Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Gehling UM, Lindemann K, Weidner N, Zuzarte ML, Adamkiewicz J, Elsässer HP, Müller R, Havemann K. Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation; research in biological diversity*, 2000 May;65(5):287-300. PMID: 10929208
- Fernandez Pujol B, Lucibello FC, Zuzarte M, Lütjens P, Müller R, Havemann K. Dendritic cells derived from peripheral monocytes express endothelial markers and in the presence of angiogenic growth factors differentiate into endothelial-like cells. *European journal of cell biology*, 2001 Jan;80(1):99-110. PMID: 11211940
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science (New York, N.Y.)*, 1998 Mar 6;279(5356):1528-30. PMID: 9488650
- Forbes SJ, Russo FP, Rey V, Burra P, Ruge M, Wright NA, Alison MR. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis. *Gastroenterology*, 2004 Apr;126(4):955-63. PMID: 15057733
- Freund D, Oswald J, Feldmann S, Ehninger G, Corbeil D, Bornhäuser M. Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34⁺ and CD133⁺ blood stem cells derived from a single donor. *Cell proliferation*, 2006 Aug;39(4):325-32. PMID: 16872366
- Fujii H, Hirose T, Oe S, Yasuchika K, Azuma H, Fujikawa T, Nagao M, Yamaoka Y. Contribution of bone marrow cells to liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Journal of hepatology*, 2002 May;36(5):653-9. PMID: 11983449
- Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology*, 1994 Apr;70(4):511-6. PMID: 7513770
- Fürst G, Schulte am Esch J, Poll LW, Hosch SB, Fritz LB, Klein M, Godehardt E, Krieg A, Wecker B, Stoldt V, Stockschräder M, Eisenberger CF, Mödder U, Knoefel WT. Portal vein embolization and autologous CD133⁺ bone marrow stem cells for liver

- regeneration: initial experience. *Radiology*, 2007 Apr;243(1):171-9. Epub 2007 Feb 20. PMID: 17312278
- Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schäfer B, Hossfeld DK, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 2000 May 15;95(10):3106-12. PMID: 10807776
- Gehling UM, Willems M, Dandri M, Petersen J, Berna M, Thill M, Wulf T, Müller L, Pollok JM, Schlagner K, Faltz C, Hossfeld DK, Rogiers X. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *Journal of hepatology*, 2005 Nov;43(5):845-53. Epub 2005 Jun 28. PMID: 16139387
- Gehling UM, Willems M, Schlagner K, Benndorf RA, Dandri M, Petersen J, Sterneck M, Pollock JM, Hossfeld DK, Rogiers X. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in patients with liver cirrhosis. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2010 Jan 14;16(2):217-24. PMID: 20066741
- Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)AC133(+) endothelial precursor cells. (Full) *Circulation research*, 2001 Feb 2;88(2):167-74. PMID: 11157668
- Goyert SM, Ferrero E. Biochemical analysis of myeloid antigens and cDNA expression of gp55 (CDw14). In: *Leucocyte Typing III. (White Cell Differentiation Antigens* (ed. A.J. McMichael), p.613, Oxford University Press 1987, Oxford.
- Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nature medicine*, 2002 Jun;8(6):607-12. PMID: 12042812
- Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer research*, 1962 Aug;22:842-9. PMID: 13902009
- Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, Dziarski R. CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry*, 1996 Sep 20;271(38):23310-6. PMID: 8798531

- Harb R, Xie G, Lutzko C, Guo Y, Wang X, Hill CK, Kanel GC, DeLeve LD. Bone marrow progenitor cells repair rat hepatic sinusoidal endothelial cells after liver injury. *Gastroenterology*, 2009 Aug;137(2):704-12. PMID: 19447108
- Hardwick LJ, Velamakanni S, van Veen HW. The emerging pharmacotherapeutic significance of the breast cancer resistance protein (ABCG2). *British journal of pharmacology*, 2007 May;151(2):163-74, Epub 2007 Mar 20. PMID: 17375082
- Harraz M, Jiao C, Hanlon HD, Hartley RS, Schatteman GC. CD34-blood-derived human endothelial cell progenitors. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2001;19(4):304-12. PMID: 11463950
- Harris RG, Herzog EL, Bruscia EM, Grove JE, Van Arnam JS, Krause DS. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science (New York, N.Y.)*, 2004 Jul 2;305(5680):90-3. PMID: 15232107
- Haruna Y, Saito K, Spaulding S, Nalesnik MA, Gerber MA. Identification of bipotential progenitor cells in human liver development. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1996 Mar;23(3):476-81. PMID: 8617427
- Hatch HM, Zheng D, Jorgensen ML, Petersen BE. SDF-1alpha/CXCR4: a mechanism for hepatic oval cell activation and bone marrow stem cell recruitment to the injured liver of rats. *Cloning and stem cells*, 2002;4(4):339-51. PMID: 12626097
- Hayashi T, Kishiwada M, Fujii K, Yuasa H, Nishioka J, Ido M, Gabazza EC, Suzuki K. Lipopolysaccharide-induced decreased protein S expression in liver cells is mediated by MEK/ERK signalling and NFkappaB activation: involvement of membrane-bound CD14 and toll-like receptor-4. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*, 2006 Aug;4(8):1763-73. PMID: 16879219
- Heidenreich S. Monocyte CD14: a multifunctional receptor engaged in apoptosis from both sides. *Journal of leucocyte biology*, 1999 Jun;65(6):737-43. PMID: 10380893
- Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2006 Dec;24(12):2840-50. PMID: 16945998
- Hilbe W, Dirnhofer S, Oberwasserlechner F, Schmid T, Gunsilius E, Hilbe G, Wöll E, Kähler CM. CD133 positive endothelial progenitor cells contribute to the tumour vasculature in non-

- small cell lung cancer. *Journal of clinical pathology*, 2004 Sep;57(9):965-9. PMID: 15333659
- Holmes N. CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*, 2006 Feb;117(2):145-55. PMID: 16423050
- Housset C. Biliary epithelium, hepatocytes and oval cells. *Le revue du praticien*, 2000 Dec 1;50(19):2106-11. PMID: 11213452
- Hoyes AD, Riches DJ, Martin BG. The fine structure of haematopoiesis in the human fetal liver. I. The haematopoietic precursor cells. *Journal of anatomy*, 1973 May;115(pt 1):99-111. PMID: 4728268
- Hsia CC, Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Occurrence of oval-type cells in hepatitis B virus-associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1992 Dec;16(6):1327-33. PMID: 1280243
- Hu B, Colletti LM. Stem cell factor and c-kit are involved in hepatic recovery after acetaminophen-induced liver injury in mice. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 2008 Jul;295(1):G45-G53. Epub 2008 May 8. PMID: 18467506
- Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, Gallagher MP, Gill DR, Hubbard RE, Higgins CF. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature*, 1990 Jul 26;346(6282):362-5. PMID: 1973824
- Irie-Sasaki J, Sasaki T, Penninger JM. CD45 regulated signalling pathways. *Current topics in medicinal chemistry*, 2003;3(7):783-96. PMID: 12678844
- Jackson KA, Mi T, Godell MA. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999 Dec 7;96(25):14482-6. PMID: 10588731
- Jang YY, Collector MI, Baylin SB, Diehl AM, Sharkis SJ. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nature cell biology*, 2004 Jun;6(6):532-9. Epub 2004 May 9. PMID: 15133469

- Jersmann HP, Hii CS, Hodge GL, Ferrante A. Synthesis and surface expression of CD14 by human endothelial cells. *Infection and immunity*, 2001 Jan;69(1):479-85. PMID: 11119540
- Jozefczuk J, Stachelscheid H, Chavez L, Herwig R, Lehrach H, Zeilinger K, Gerlach JC, Adjaye J. Molecular characterization of cultured adult human liver progenitor cells. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 2010 Oct;16(5):821-34. PMID: 19874131
- Kadawa H, Ogawa M. Hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. *Blood cells Mol Dis*, 2001 May-Jun;27(3):605-9. PMID: 11482874
- Kanazawa Y, Verma IM. Little evidence of bone marrow-derived hepatocytes in the replacement of injured liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11850-3. Epub 2003 Aug 14. PMID: 12920184
- Khuu DN, Najimi M, Sokal EM. Epithelial cells with hepatobiliary phenotype: is it another stem cell candidate for healthy adult human liver? *World journal of gastroenterology: WJG*, 2007 Mar 14;13(10):1554-60. PMID: 17461448
- Kim CH, Broxmeyer HE. In vitro behaviour of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood*, 1998 Jan 1;91(1):100-10. PMID: 9414273
- Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, Dean M, Sharp JG, Cowan K. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clinical cancer research*, 2002 Jan;8(1):22-8. PMID: 11801536
- Kiss A, Schnur J, Szabo Z, Nagy P. Immunohistochemical analysis of atypical ductular reactions in the human liver, with special emphasis on the presence of growth factors and their receptors. *Liver*, 2001 Aug;21(4):237-46. PMID: 11454186
- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine*, 2001 Apr;7(4):430-6. PMID: 11283669
- Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-

- induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *The journal of clinical investigation*, 2003 Jul;112(2):160-9. PMID: 12865405
- Körbling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Albitar M, Champlin RE, Estrov Z. Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *The New England journal of medicine*, 2002 Mar 7;346(10):738-46. PMID: 11882729
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure biology, and clinical utility. *Blood*, 1996 Jan 1;87(1):1-13. PMID: 8547630
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001 May 4;105(3):369-77. PMID: 11348593
- Kubota H, Reid LM. Clonogenic hepatoblasts, common precursors for hepatocytic and biliary lineages, are lacking classical major histocompatibility complex class I antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000 Oct 24;97(22):12132-7. PMID: 11050242
- Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzec J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2005 Aug;23(7):879-94. PMID: 15888687
- Kwon Y, Lee SK, Kim JS, Ro JY, Yu E. Synchronous hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma arising on two different dysplastic nodules. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2002 Oct;15(10):1096-101. PMID: 12379757
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine*, 2000 Nov;6(11):1229-34. PMID: 11062533
- Lange C, Li Z, Fang L, Baum C, Fehse B. CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo. *Stem cells and development*, 2007 Apr; 16 (2): 297-304. PMID: 17521240
- Larsson LI, Bjerregaard B, Talts JF. Cell fusion in mammals. *Histochemistry and cell biology*, 2008 May;129(5):551-61. PMID: 18351375

- Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jürgens K, Miche E, Böhm M, Nickenig G. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*, 2004 Jan 20;109(2):220-6. Epub 2003 Dec 22. PMID: 14691039
- LeCouter J, Moeitz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, Hillan KJ, Ferrara N. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science (New York, N.Y.)*, 2003 Feb 7;299(5608):890-3. PMID: 12574630
- Lemmer ER, Shepard EG, Blakolmer K, Kirsch RE, Robson SC. Isolation from human fetal liver of cells co-expressing CD34 haematopoietic stem cell and CAM 5.2 pancytokeratin markers. *Journal of hepatology*, 1998 Sep;29(3):450-4. PMID: 9764993
- Lemoli RM, Catani L, Talarico S, Loggi E, Gramenzi A, Baccarani U, Fogli M, Grazi GL, Aluigi M, Marzocchi G, Bernardi M, Pinna A, Bresadola F, Baccarani M, Andreone P. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2006 Dec;24(12):2817-25. Epub 2006 Aug 24. PMID: 16931769
- Li WL, Su J, Yao YC, Tao XR, Yan YB, Yu HY, Wang XM, Li JX, Yang YJ, Lau JT, Hu YP. Isolation and characterization of bipotent liver progenitor cells from adult mouse. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2006 Feb;24(2):322-32. Epub 2005 Aug 18. PMID: 16109753
- Liu S, Gallo DJ, Green AM, Williams DL, Gong X, Shapiro RA, Gambotto AA, Humphris EL, Vodovotz Y, Billiar TR. Role of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 2002 Jul;70(7):3433-42. PMID: 12065483
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *The Journal of biological chemistry*, 1994 Jan 7;269(1): 232-7. PMID: 8276799
- Loges S, Fehse B, Brockmann MA, Lamszus K, Butzal M, Guckenbiehl M, Schuch G, Ergün S, Fischer U, Zander AR, Hossfeld DK, Fiedler W, Gehling UM. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem cells and development*, 2004 Jun;13(3):229-42. PMID: 15186719
- Madl C. Abdominelle Notfälle. *Medizinische Therapie*, 2005;17:1491-1498.

-
- Martinez-Hernandez A, Amenta PS. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *The FASEB journal*, 1995 Nov;9(14):1401-10. PMID: 7589981
- Mason D, ed., *Leucocyte Typing VII: white cell differentiation antigens. Proceedings of the seventh international workshop and conference held in Harrogate, United Kingdom.* Oxford University Press, 2002
- Mason DY, André P, Bensussan A, Buckley C, Civin C, Clark E, de Haas M, Goyert S, Hadam M, Hart D, Horejsí V, Meuer S, Morissey J, Schwartz-Albiez R, Shaw S, Simmons D, Uguccioni M, van der Schoot E, Viver E, Zola H. CD antigens 2001. *Tissue Antigens*, 2001 Dec; 58 (6): 425-30. PMID: 11929596
- McNiece IK, Langley KE, Zsebo KM. Recombinant human stem cell factor synergises with GM-CSF, G-CSF, IL-3 and epo to stimulate human progenitor cells of the myeloid and erythroid lineages. *Experimental hematology*, 1991 Mar;19(3):226-31. PMID: 1704845
- Mead JE, Fausto N. Transforming growth factor alpha may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989 Mar;86(5):1558-62. PMID: 2922399
- Menthena A, Deb N, Oertel M, Grozdanov PN, Sandhu J, Shah S, Guha C, Shafritz DA, Dabeva MD. Bone marrow progenitors are not the source of expanding oval cells in injured liver. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2004;22(6):1049-61. PMID: 15536195
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *The FASEB journal*, 1990 Feb 1;4(2):176-87. PMID: 2404819.
- Michalopoulos GK. Liver regeneration. *Journal of cellular physiology*, 2007 Nov;213(2):286-300. PMID: 17559071
- Michalopoulos GK, DeFrances NC. Liver regeneration. *Science (New York, N.Y.)*, 1997 Apr 4;276(5309):60-6. PMID: 9082986
- Miettinen M, Virolainen M, Maarit-Sarlomo-Rikala. Gastrointestinal stromal tumors – value of CD34 antigen in their identification and separation of true leiomyomas and schwannomas. *The American journal of surgical pathology*, 1995 Feb;19(2):207-16. PMID: 7530409

-
- Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 2001 Jun;226(6):507-20. PMID: 11395921
- Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, 1997 Dec 15;90(12):5013-21. PMID: 9389721
- Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. *The Journal of pathology*, 2008 Jan;214(1):3-9. PMID: 18067118
- Morici G, Zangla D, Santoro A, Pelosi E, Petrucci E, Gioia M, Bonanno A, Profita M, Bellia V, Testa U, Bonsignore MR. Supramaximal exercise mobilizes hematopoietic progenitors and reticulocytes in athletes. *American journal of physiology*, 2005 Nov;289(5):R1496-503. Epub 2005 Jul 14. PMID: 16020520
- Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 1997 Feb 7; 88 (3):287-98. PMID: 9039255
- Munugalavadla V, Kapur R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2005 Apr;54(1):63-75. PMID: 15780908
- Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunological reviews*, 2000 Oct;177:175-84. PMID: 11138774
- Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR) 2 as well as TLR4. Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *European journal of biochemistry/ FEBS*, 2001 Aug;268(16):4580-9. PMID: 11502220
- Nagy P, Bisgaard HC, Thorgeirsson SS. Expression of hepatic transcription factors during liver development and oval cell differentiation. *The Journal of cell biology*, 1994 Jul;126(1):223-33. PMID: 8027180
- Nocka K, Buck J, Levi E, Besmer P. Candidate ligand for the c-kit transmembrane kinase receptor : KL, a fibroblast derived growth factor stimulates mast cells and erythroid progenitors. *The EMBO journal*, 1990 Oct;9(10):3287-94. PMID: 1698611
- Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, Taneera J, Fleischmann BK, Jacobsen SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes

- at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine*, 2004 May;10(5):494-501. Epub 2004 Apr 25. PMID: 15107841
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, Moser B. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*, 1996 Aug 29;382(6594):833-5. PMID: 8752281
- Oosterlee A, Rahmel A. Annual report 2009. Annual Report/ Eurotransplant International Foundation, 2009: 67-69. ISBN-13: 978-90-71658-29-7.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001 Apr 5;410(6829):701-5. PMID: 11287958
- Pablos JL, Amara A, Bouloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, Delaunay T, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *The American journal of pathology*, 1999 Nov;155(5):1577-86. PMID: 10550315
- Pardal R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nature reviews. Cancer*, 2003 Dec;3(12):895-902. PMID: 14737120
- Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 2000 Feb 1;95(3):952-8. PMID: 10648408
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science (New York, N.Y.)*, 1999 May 14;284(5417):1168-70. PMID: 10325227
- Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine*, 2003 Jun;9(6): 702-12. PMID: 12778169
- Ratajczak MZ, Kucia M, Reza R, Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*, 2004 Jan;18(1):29-40. PMID: 14586476

- Ren X, Hogaboam C, Carpenter A, Colletti L. Stem cell factor restores hepatocyte proliferation in IL-6 knockout mice following 70% hepatectomy. *The Journal of clinical investigation*, 2003 Nov;112(9):1407-18. PMID: 14597766
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weismann IL. Stem cells, cancer, cancer stem cells. *Nature*, 2001 Nov 1;414(6859):105-11. PMID: 11689955.
- Ribatti D. The involvement of endothelial progenitor cells in tumor angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2004 Jul-Sep;8(3):294-300. PMID: 15491505
- Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, Bhagat G, Bhathal PS, Bioulac-Sage P, Brunt EM, Crawford JM, Crosby HA, Desmet V, Finegold MJ, Geller SA, Gouw AS, Hytiroglou P, Knisely AS, Kojiro M, Lefkowitz JH, Nakanuma Y, Olynyk JK, Park YN, Portmann B, Saxena R, Scheuer PJ, Strain AJ, Thung SN, Wanless IR, West AB. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2004 Jun;39(6):1739-45. PMID: 15185318
- Roskams T, De Vos R, Van Eyken P, Myazaki H, Van Damme B, Desmet V. Hepatic OV-6 expression in human liver disease and rat experiments: evidence for hepatic progenitor cells in man. *Journal of hepatology*, 1998 Sep;29(3):455-63. PMID: 9764994
- Roskams T, van den Oord JJ, De Vos R, Desmet VJ. Neuroendocrine features of reactive bile ductules in cholestatic liver disease. *The American journal of pathology*, 1990 Nov;137(5):1019-25. PMID: 1700614
- Roskams T, Yang SQ, Koteish A, Durnez A, DeVos R, Huang X, Achten R, Verslype C, Diehl AM. Oxidative stress and oval cell accumulation in mice and humans with alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. *the American journal of pathology*, 2003 Oct;163(4):1301-11. PMID: 14507639
- Rossi DJ, Jamieson CH, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell*, 2008 Feb 22;132(4):681-96. PMID: 18295583
- Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 2007 Oct;25(10):2419-29. PMID: 17585168
- Ruck P, Xiao JC, Pietsch T, Von Schweinitz D, Kaiserling E. Hepatic stem cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6. *Histopathology*, 1997 Oct;31(4):324-9. PMID: 9363447

- Ruhnke M, Ungefroren H, Nussler A, Martin F, Brulport M, Schormann W, Hengstler JG, Klapper W, Ulrichs K, Hutchinson JA, Soria B, Parwaresch RM, Heeckt P, Kremer B, Fändrich F. Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells. *Gastroenterology*, 2005 Jun;128(7):1774-86. PMID: 15940611
- Sabin FR. Preliminary note on the differentiation of angioblasts and the method by which they produce blood-vessels, blood-plasma and red blood-cells as seen in the living chick. 1917. *Journal of hematology & stem cell research*, 2002 Feb;11(1):5-7. PMID: 11846999. Reprinted from the *Anatomical Record*, Vol. 13, pp. 199-204, 1917.
- Sakaida I, Terai S, Yamamoto N, Aoyama K, Ishikawa T, Nishina H, Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2004 Dec;40(6):1304-11. PMID: 15565662
- Sarkadi B, Homoloya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiological reviews*, 2006 Oct;86(4):1179-236. PMID: 17015488
- Sarlomo-Rikala M, Kovatich AJ, Barusevicius A, Miettinen M. CD117: a sensitive marker for gastrointestinal stromal tumors that is more specific than CD34. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 1998 Aug;11(8):728-34. PMID: 9720500
- Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H. Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labelled with nestin-GFP transgene. *The journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 2001 Jun 1;21(11):3895-903. PMID: 11356877
- Schirmacher P, Geerts A, Jung W, Pietrangelo A, Rogler CE, Dienes HP. The role of Ito cells in the biosynthesis of HGF-SF in the liver. *EXS*, 1993;65:285-99. PMID: 8380738
- Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, Eskafi S, Graffy C, Ludwig J, Strasser RH, Daniel WG. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovascular research*, 2001 Feb 16;49(3):671-80. PMID: 11166280
- Schmelzer E, Zhang L, Bruce A, Wauthier E, Ludlow J, Yao HL, Moss N, Melhem A, McClelland R, Turner W, Kulik M, Sherwood S, Tallheden T, Cheng N, Furth ME, Reid LM. Human

- hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *The Journal of experimental medicine*, 2007 Aug 6;204(8):1973-8. PMID: 17664288
- Schöler Hans R. (2007). *The Potential of Stem Cells: An Inventory*. in Nikolaus Knoepffler, Dagmar Schipanski and Stefan Lorenz Sorgner. *Humanbiotechnology as Social Challenge*. Ashgate Publishing, Ltd p. 28. ISBN 0754657558
- Scoazec JY, Feldmann G. In situ immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1991 Nov;14(5):789-97. PMID: 1937383
- Sell S. Liver stem cells. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.*, 1994 Jan;7(1):105-12. PMID: 8159639
- Seta N, Kuwana M. Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *The Keio journal of medicine*, 2007 Jun;56(2):41-7. PMID: 17609587
- Shimano K, Satake M, Okaya A, Kitanaka J, Kitanaka N, Takemura M, Sakagami M, Terada N, Tsujimura T. Hepatic oval cells have the side population phenotype defined by expression of ATP-binding cassette transporter ABCG2/BCRP1. *The American journal of pathology*, 2003 Jul;163(1):3-9. PMID: 12819005
- Shirakawa K, Furuhashi S, Watanabe I, Hayase H, Shimizu A, Ikarashi Y, Yoshida T, Terada M, Hashimoto D, Wakasugi H. Induction of vasculogenesis in breast cancer models. *British journal of cancer*, 2002 Dec 2;87(12):1454-61. PMID: 12454777
- Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 1995 Aug 10;28(3):495-500. PMID: 7490086
- Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, Homigo A, Kushner J, Milde T, St. Clair R, Baljevic M, White I, Jin DK, Chadburn A, Murphy AJ, Valenzuela DM, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, D'Angelica M, Kemeny N, Lyden D, Rafii S. CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *The Journal of clinical investigation*, 2008 Jun;118(6):2111-20. PMID: 18497886
- Snippert HJ, van Es JH, van den Born M, Begthel H, Stange DE, Barker N, Clevers H. Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology*, 2009 Jun;136(7):2187-2194.e1. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19324043

- Song PI, Park YM, Abraham T, Harten B, Zivony A, Neparadize N, Armstrong CA, Ansel JC. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *The Journal of investigative dermatology*, 2002 Aug;119(2):424-32. PMID: 12190866
- Spee B, Carpino G, Schotanus BA, Katoonizadeh A, Vander Borgh S, Gaudio E, Roskams T. Characterisation of the liver progenitor cell niche in liver diseases: Potential involvement of Wnt and Notch signalling. *Gut*, 2010 Feb;59(2):247-57. PMID: 19880964
- Steiner S, Niessner A, Ziegler S, Richter B, Seidinger D, Pleiner J, Penka M, Wolzt M, Huber K, Wojta J, Minar E, Kopp CW. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 2005 Aug;181(2):305-10. Epub 2005 Feb 12. PMID: 16039284
- Sugawara S, Sugiyama A, Nemoto E, Rikiishi H, Takada H. Heterogeneous expression and release of CD14 by human gingival fibroblasts: characterization and CD14-mediated interleukin-8 secretion in response to lipopolysaccharide. *Infection and immunity*, 1998 Jul;66(7):3043-9. PMID: 9632564
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2004 Oct;5(10):836-47. PMID: 15459664
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 2002 Apr 4;416(6880):542-5. Epub 2002 Mar 13. PMID: 11932747
- Terada R, Yamamoto K, Hakoda T, Shimada N, Okano N, Baba N, Ninomiya Y, Gershwin ME, Shiratori Y. Stromal cell-derived factor-1 from biliary epithelial cells recruits CXCR4-positive cells: implications for inflammatory liver diseases. *Laboratory investigation: a journal of technical methods and pathology*, 2003 May;83(5):665-72. PMID: 12746476
- Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, Henegariu O, Krause DS. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology (Baltimore, MD.)*, 2000 Jul;32(1):11-6. PMID: 10869283
- Thill M, Schlagner K, Altenähr S, Ergün S, Faragher RG, Kilic N, Bednarz J, Vohwinkel G, Rogiers X, Hossfeld DK, Richard G, Gehling UM. A novel population of repair cells identified in the stroma of the human cornea. *Stem cells and development*, 2007 Oct; 16(5): 733-45. PMID: 17999595

- Thomas DB, Yoffey JM. Human foetal Haematopoiesis. II. Hepatic haematopoiesis in the human foetus. *British journal of haematology*, 1964 Apr;10:193-7. PMID: 14141618
- Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *The Journal of biological chemistry*, 1989 Jun 25;264(18):10867-71. PMID: 2471708
- Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide binding protein and CD14 in LPS dependent macrophage activation. *Immunobiology*, 1993 Apr;187(3-5):227-32. PMID: 7687234
- Tomita M, Yamamoto K, Kobashi H, Ohmoto M, Tsuji T. Immunohistochemical phenotyping of liver macrophages in normal and diseased human liver. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 1994 Aug;20(2):317-25. PMID: 7519162
- Tomuleasa C, Soritau O, Rus-Ciucu D, Pop T, Todea D, Mosteanu O, Pintea B, Foris V, Susman S, Kacso G, Irimie A. Isolation and characterization of hepatic cancer stem cells with stem-like properties from hepatocellular carcinoma. *Journal of gastrointestinal and liver diseases*, 2010 Mar;19(1):61-7. PMID: 20361077
- Ueno T, Nakamura T, Torimura T, Sata M. Angiogenic cell therapy for hepatic fibrosis. *Medical molecular morphology*, 2006 Mar;39(1):16-21. PMID: 16575510
- Ulvestad E, Williams K, Bjerkvig R, Tiekotter K, Antel J, Matre R. Human microglial cells have phenotypic and functional characteristics in common with both macrophages and dendritic antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology*, 1994 Dec;56(6):732-40. PMID: 7996050
- Vassilopoulos G, Wang PR, Russell DW. Transplanted bone marrow regenerates liver by cellfusion. *Nature*, 2003 Apr 24;422(6934):901-4. Epub 2003 Mar 30. PMID: 12665833
- Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeffner-Cavaillon N, Goldman M. Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 1997 Mar 15;158(6):2919-25. PMID: 9058830
- Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11881-8. Epub 2003 Aug 5. PMID: 12902545

- Wang X, Ge S, McNamara G, Hao QL, Crooks GM, Nolte JA. Albumin-expressing hepatocyte-like cells develop in the livers of immune-deficient mice that received transplants of highly purified human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2003 May 15;101(10):4201-8. Epub 2003 Jan 30. PMID: 12560238
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 2003 Apr 24;422(6934):897-901. PMID: 12665832
- Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal protrusions of non-epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997 Nov 11;94(23):12425-30. PMID: 9356465
- Willenbring H, Bailey AS, Foster M, Akkari Y, Dorrell C, Olson S, Finegold M, Fleming WH, Grompe M. Myelomonocytic cells are sufficient for therapeutic cell fusion in liver. *Nature medicine*, 2004 Jul;10(7):744-8. Epub 2004 Jun 13. PMID: 15195088
- Wojakowski W, Tendera M, Michałowska A, Majka M, Kucia M, Maślankiewicz K, Wyderka R, Ochała A, Ratajczak MZ. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 2004 Nov 16;110(20):3213-20. Epub 2004 Nov 8. PMID: 15533859
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science (New York, N.Y.)*, 1990 Sep 21;249(4975):1431-3. PMID: 1698311
- Wu H, Klingmüller U, Acurio A, Hsiao JG, Lodish HF. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1997 Mar 4;94(5):1806-10. PMID: 9050860
- Wu XZ, Yu XH. Bone marrow cells: the source of hepatocellular carcinoma? *Medical hypotheses*, 2007;69(1):36-42. PMID: 17300877
- Wu Y, Wu PY. CD133 as a marker for cancer stem cells: progresses and concerns. *Stem cells and development*, 2009 Oct;18(8):1127-34. PMID: 19409053

- Xu W, Cao L, Yin ZF. Progress and prospects in cancer stem cell research for hepatocellular carcinoma. *Ai zheng = Chinese journal of cancer*, 2009 Sep;28(9):1004-8. PMID: 19728923
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 1997 Dec 15; 90 (12):5002-12. PMID: 9389720
- Yu D, Sun X, Qiu Y, Zhou J, Wu Y, Zhuang L, Chen J, Ding Y. Identification and clinical significance of mobilized endothelial progenitor cells in tumor vasculogenesis of hepatocellular carcinoma. *Clinical cancer research*, 2007 Jul 1;13(13):3814-24. PMID: 17606712
- Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. *The Journal of biological chemistry*, 2002 Jun 7;277(23):20711-6. PMID: 12042327
- Zhao Y, Glesne D, Huberman E. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003 Mar 4;100(5):2426-31. Epub 2003 Feb 26. PMID: 12606720
- Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. The ABC transporter *Bcrp1/ABCG2* is expressed in an wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nature medicine*, 2001 Sep;7(9):1028-34. PMID: 11533706
- Ziegler-Heitbrock HW, Pechumer H, Petersmann I, Durieux JJ, Vita N, Labeta MO, Ströbel M. CD14 is expressed and functional in human B cells. *European journal of immunology*, 1994 Aug;24(8):1937-40. PMID: 7520002
- Zocco MA, Piscaglia AC, Giuliani F, Arena V, Novi M, Rinninella E, Tortora A, Rumi C, Nuzzo G, Vecchio FM, Bombardieri G, Gasbarrini A. CD133+ stem cell mobilization after partial hepatectomy depends on resection extent and underlying disease. *Digestive and liver disease*, 2010 Aug 3. (Epub ahead of print). PMID: 20688587

8 Danksagung

Zum Abschluss möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin Frau PD. Dr. Ursula Gehling bedanken. Sie hat mir dieses Thema überlassen und beriet mich kompetent bei inhaltlichen Fragen und unterstützte mich fortwährend.

Für die geduldige Einweisung in alle praktischen Tätigkeiten möchte ich mich vor allem bei Kathleen Schlagner bedanken.

Weiterhin bin ich Ralph A. Benndorf aus dem Institut der Pharmakologie für seinen kompetenten Beitrag überaus dankbar.

Besonders Juana Münster sei für ihre kontinuierliche, gewissenhafte und aufopferungsvolle Unterstützung Dank ausgesprochen.

Mein Dank gilt auch Michael Bullinger, der mich geduldig bei dieser Arbeit begleitet hat und mir immer wieder neue Kraft gegeben hat.

9 Anhang

9.1 Tabellen zu Ergebnissen der Durchflusszytometrie (zu Kapitel 5.1)

9.1.1 Tabellen zu den Darstellungen der zeitlichen Verläufe

Angegeben sind die prozentualen Anteile der durchflusszytometrisch ermittelten positiven Zellen aus der mononukleären Zellfraktion (MNC) bzw. zusätzlich der positiven Monozyten (Monoz) und Lymphozyten (Lymphoz) bei CD14⁺ und CXCR4⁺ Zellen zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

Daten zu Abbildung 5.1

CD133 ⁺ /CD45 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	3,1	5,7		3,9	2,7	1,8		2,4
Nr. 2	5	5	5,9							
Nr. 3		1,1	2,6	2,3		2,2	2,3	1		
Nr. 4	0,6	1	2,3	0,1	0,3	0,3	0,3	0,2		
Nr. 5	1,3	1,3	1,3		0,9	0,3	0,4	0,8		
Nr. 6	1,3	0,6	0,5	1,4	0,9		0,5	0,9		
MW	2,26	2,45	2,52	1,925	1,2	1,15	0,875	1,06		
SEM	0,8	0,926	0,923	0,798	0,52	0,497	0,477	0,363		

CD133 ⁺ /CD14 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	2,8	3,7		6,1	3,4	1,5		2,8
Nr. 2	5,3	5,4	5,7							
Nr. 3		1,7	2,8	2,1		2	0,7	1,5		
Nr. 4	0,9	1,1	2,6	0,2	0,4	0,5	0,4	0,3		
Nr. 5	0,9	0,9	1,3		1,2	0,4	0,6	1		
Nr. 6	1,6	0,6	0,8	1,3	0,9		0,5	0,6		
MW	2,3	2,233	2,64	2,425	1,475	1,1	0,55	1,24		
SEM	0,826	0,779	0,854	1,285	0,663	0,389	0,065	0,439		

CD133 ⁺ /CD14 ⁻	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	0,1	0		0,1	0	0		0,1
Nr. 2	1,1	1,1	1							
Nr. 3		0	0	0,9	0,3	0,3	0,4	0,9		
Nr. 4	0,5	0	1,2	0	0,4	0,3	0,8	0,3		

		Nr. 5	0,3	0	0,4		0,4	0,3	0	0,4
		Nr. 6	0,6	0,3	0,7	0,1	0,6		0	0,5
		MW	0,52	0,233	0,66	0,275	0,34	0,225	0,3	0,44
		SEM	0,169	0,18	0,214	0,21	0,098	0,075	0,191	0,133
CD133 ⁺ /CD34 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2		0,3
		Nr. 2	0,8	0,2	0,2					
		Nr. 3		0,1	0,3	0,5		0,4	0,4	0,4
		Nr. 4	0,2	0,5	0,1	0,1	0	0,2	0,1	0,1
		Nr. 5	0	0	0,1		0,2	0,1	0	0,1
		Nr. 6	0,2	0,1		0,1	0,3		0,3	0,3
		MW	0,28	0,183	0,2	0,25	0,175	0,225	0,2	0,24
		SEM	0,136	0,07	0,045	0,096	0,063	0,063	0,091	0,06
CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	1	1,8		0				0,5
		Nr. 2	2,6	0	2,1					
		Nr. 3		0,5	0,8	0,7		0,4	0,3	0,2
		Nr. 4	0,1	0,6	0,7	0,1	0	0,1	0	0,1
		Nr. 5	0,2	0,3	0,4		0,2	0,1	0,1	0,2
		Nr. 6	0,3	0,1	0,1	0,3	0,1		0,1	0,2
		MW	0,84	0,55	0,82	0,275	0,1	0,2	0,125	0,24
		SEM	0,468	0,267	0,343	0,155	0,058	0,1	0,063	0,068

Daten zu Abbildung 5.3

CD133 ⁺ /CD45 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	2,9	5,6	2,9	2,5
CD133 ⁺ /CD14 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	2	5,4	2,7	1,9
CD133 ⁺ /CD14 ⁻	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,7	0,4	0,4	0,9
CD133 ⁺ /CD34 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,4	1,3	0,5	0,5
CD133 ⁺ /CXCR4 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,8	1,8	0,7	0,5

Daten zu Abbildung 5.6

CD34 ⁺ /CD45 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	0,4	0,3		0,3	0,2	0,5		0,5
		Nr. 2	0,4	0,6	1,2					
		Nr. 3		0,2	0,2	0,6		0,4	0,9	1,1
		Nr. 4	0,5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4
		Nr. 5	0,2	0,1	0,1		0,3	0,3	0,1	0,4
		Nr. 6	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3		0,2	0,6
		MW	0,34	0,267	0,38	0,35	0,25	0,35	0,4	0,6
		SEM	0,06	0,071	0,206	0,087	0,029	0,065	0,178	0,13

CD34 ⁺ /c-kit ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	0,1	0,1		0,1	0,2	0,8		0,2
		Nr. 2	0,7	0,4	1					
		Nr. 3		0,3	0,5	0,4		0,3	0,6	0,9
		Nr. 4	0,1	0,2	0,1	0	0,1	0,2	0,2	0,2
		Nr. 5	0,2	0	0,1		0,2	0,2	0	0,2
		Nr. 6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,3		0,1	0,4
		MW	0,26	0,183	0,36	0,15	0,2	0,375	0,225	0,38
		SEM	0,112	0,06	0,178	0,087	0,041	0,144	0,131	0,136

CD34 ⁺ /bcrp-1 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	0	0		0	0,1	0,1		0,1
		Nr. 2	0,2	0,1	0					
		Nr. 3		0	0	0,1		0,3	0,1	0,1
		Nr. 4	0,1	0	0	0	0	0	0,1	0
		Nr. 5	0	0	0		0	0	0	0
		Nr. 6	0,1	0	0	0	0,1		0,1	0,2
		MW	0,08	0,017	0	0,025	0,05	0,1	0,075	0,08
		SEM	0,037	0,017	0	0,025	0,029	0,071	0,025	0,037

Daten zu Abbildung 5.8

CD34 ⁺ /CD45 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,4	0,8	0,8	0,5

CD34 ⁺ /c-kit ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,4	0,9	0,2	0,4

CD34 ⁺ /bcrp-1 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,3	0,2	0,1	0,1

Daten zu Abbildung 5.9

c-kit ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	2,4	4,2		3,1	4,8	5		1,9
		Nr. 2								
		Nr. 3		5	5	6,4		5	1,9	5,6
		Nr. 4	2,4	3,8	6,3	2,1	2,3	2,9	3,7	2,1
		Nr. 5	4,3	1,1	2,7		1,9	1,8	4,8	2,2
		Nr. 6	0,8	6,6	2,1	2,4	3,1		0,1	4,2
		MW	2,475	4,14	4,025	3,5	3,025	3,675	2,625	3,2
		SEM	0,716	0,899	0,983	0,989	0,642	0,797	1,032	0,73
c-kit ⁺ /CXCR4 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	2	5,8		0				3,5
		Nr. 2								
		Nr. 3		4,1	2,9	2,7		2,2	1,4	3,2
		Nr. 4	0,6	4,2	2,3	1,9	0,5	2,1	0,4	0,5
		Nr. 5	1,3	0,7	0,8		1,1	0,3	1,1	0,9
		Nr. 6	0,5	1,4	1,4	0,5	0,7		2,4	1,1
		MW	1,1	3,24	1,85	1,275	0,767	1,533	1,325	1,84
		SEM	0,349	0,95	0,466	0,622	0,176	0,617	0,415	0,626

Daten zu Abbildung 5.10

bcrp-1 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	0,2	0		0,3	0,5	0,1		0,6
		Nr. 2	0,4	0,6	0,2					
		Nr. 3		0,5	0,3	0,2		0,9	0,1	0,2
		Nr. 4	1	0	0,7	0,2	0,2	0,5	0,5	0,1
		Nr. 5	0,9	0	0,8		0,2	0,2	0,6	0,8
		Nr. 6	1,1	0,9	0,8	0,7	0,7		0,1	0,7
		MW	0,72	0,333	0,56	0,35	0,4	0,425	0,325	0,48
		SEM	0,177	0,158	0,129	0,119	0,122	0,18	0,131	0,139

Daten zu Abbildung 5.12

c-kit ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	8,2	14,5	5,4	4,6
c-kit ⁺ /CXCR4 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	1,3	2,6	2,1	1

Daten zu Abbildung 5.13

bcpr-1 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	0,5	0,4	0,2	0,5

Daten zu Abbildung 5.15

CD14 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	54,4	71,3		45,8	70,5	67,4		66,1
		Nr. 2	28,3	43,8	38,8					
		Nr. 3		34,7	28,2	14,1		38,1	18,3	17,3
		Nr. 4	11,7	35,3	28	29,7	26,5	36,7	16,1	25,2
		Nr. 5	32,8	41,4	42,8		47,9	42,4	53,6	28,2
		Nr. 6	41,1	27,6	27,1	49,8	27,9		24,6	36
		MW	33,66	42,35	32,98	34,85	43,2	46,15	28,15	34,56
		SEM	7,061	6,237	3,26	8,167	10,33	7,186	8,672	8,434

Daten zu Abbildung 5.16

CD14 ⁺	Monoz	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	91,1	95,3		88,1	94,8	96,2		92
		Nr. 2	81,3	81,3	88,2					
		Nr. 3		93,5	91,1	84,2		92,9	88,1	83,6
		Nr. 4	90,9	91,7	92,2	95,3	90,3	94,2	90,7	91,2
		Nr. 5	94,9	94,5	95,2		93,3	95,4	96,3	93,1
		Nr. 6	92,5	93,1	94	96,2	93,2		93,7	90,8
		MW	90,14	91,57	92,14	90,95	92,9	94,68	92,2	90,14
		SEM	2,322	2,114	1,213	2,889	0,941	0,72	1,599	1,682

CD14 ⁺	Lymphoz	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	2,4	5,8		6,5	6,3	3,5		5
		Nr. 2	6,1	6,1	6,5					
		Nr. 3		2,3	1	2		3,8	1,4	1,8
		Nr. 4	3,2	12,6	7	3	5,6	6,9	1,1	2,3
		Nr. 5	1,4	4,8	3,8		5,5	2,8	2,2	3,6
		Nr. 6	3,3	1,1	2,7	2	2,5		4,3	1,7
		MW	3,28	5,45	4,2	3,375	4,975	4,25	2,25	2,88
		SEM	0,783	1,643	1,135	1,068	0,844	0,908	0,722	0,629

Daten zu Abbildung 5.17

CD14 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	17,2	33	44	31,8

Daten zu Abbildung 5.18

CD14 ⁺	Monozyt	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	78,9	89,2	90,3	87,6

CD14 ⁺	Lymphoz	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	2,3	1,6	1,5	3,1

Daten zu Abbildung 5.19

CXCR4 ⁺	MNC	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	6,5	10,9		0				8,2
		Nr. 2	9,8	0	11,3					
		Nr. 3		11,8	6,3	6,8		6,4	3,7	5,3
		Nr. 4	5,6	9,8	10,9	22,7	3,6	11,3	3,9	5,7
		Nr. 5	3,2	2,2	6,3		5,4	5,6	2,8	4,3
		Nr. 6	5,5	4	5,9	2,2	4,1		1,8	4,6
		MW	6,12	6,45	8,14	7,925	4,367	7,767	3,05	5,62
		SEM	1,069	2,044	1,212	5,125	0,536	1,782	0,48	0,691

Daten zu Abbildung 5.20

CXCR4 ⁺	Monoz	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	14,6	9,7			0			
Nr. 2	21,5	0	19,5							
Nr. 3		24,8	19,6	27			6,6	13	12,9	
Nr. 4	10,3	20	17,3	19,4	9,9	13,8	10,6	6,8		
Nr. 5	3,3	8,4	8,1		9,4	9,9	7,5	7,8		
Nr. 6	11,3	11,3	10	2,3	7,9		2,2	9		
MW	12,2	12,37	14,9	12,18	9,067	10,1	8,325	10,14		
SEM	2,965	3,605	2,442	6,568	0,601	2,081	2,331	1,45		

CXCR4 ⁺	Lymphoz	Patient	prä OP	12h	24h	2d	3d	4d	5d	6d
		Nr. 1	3,1	12,3			0			
Nr. 2	14,4	0	6,3							
Nr. 3		13	5,3	11,4			8,9	5,7	8,8	
Nr. 4	7,8	18,4	12,2	29,2	5	13,4	4,1	10,2		
Nr. 5	5,7	10,3	10,7		11,6	9,7	5,9	6,5		
Nr. 6	9,4	6,2	6,6	3,8	5,8		6,6	4,3		
MW	8,08	10,03	8,22	11,1	7,467	10,67	5,575	7,28		
SEM	1,9	2,578	1,357	6,482	2,08	1,386	0,528	1,02		

Daten zu Abbildung 5.21

CXCR4 ⁺	MNC	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	6	13	6	3,9

Daten zu Abbildung 5.22

CXCR4 ⁺	Monoz	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	10,7	20,2	13,8	8,5

CXCR4 ⁺	Lymphoz	Spender	prä OP	12h	24h	3d
		Nr. 5	10,7	6,8	5,2	5,2

9.1.2 Tabellen der statistischen Korrelation (zu Kapitel 5.1.6)

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
prä OP	Nr. 1	3,1	2,4	0,2	6,5
	Nr. 2	5		0,4	9,8
	Nr. 4	0,6	2,4	1	5,6
	Nr. 5	1,3	4,3	0,9	3,2
	Nr. 6	1,3	0,8	1,1	5,5

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	4	5	5	4
Spearman r	0,0000	-0,7182	0,6669	-0,6325
P value (two-tailed)	1,0833	0,2333	0,2333	0,4167
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
12h	Nr. 1	5,7	4,2	0	10,9
	Nr. 2	5		0,6	0
	Nr. 3	1,1	5	0,5	11,8
	Nr. 4	1	3,8	0	9,8
	Nr. 5	1,3	1,1	0	2,2
	Nr. 6	0,6	6,6	0,9	4

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	5	6	6	5
Spearman r	-0,5000	-0,3947	-0,08571	0,8944
P value (two-tailed)	0,4500	0,4194	0,9194	0,0833
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
24h	Nr. 2	5,9		0,2	11,3
	Nr. 3	2,6	5	0,3	6,3
	Nr. 4	2,3	6,3	0,7	10,9
	Nr. 5	1,3	2,7	0,8	6,3
	Nr. 6	0,5	2,1	0,8	5,9

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	4	5	5	4
Spearman r	0,8000	-0,9747	0,8208	-0,7379
P value (two-tailed)	0,3333	0,0167	0,1333	0,3333
P value summary	ns	*	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	Yes	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
2d	Nr. 1	3,9	3,1	0,3	0
	Nr. 3	2,3	6,4	0,2	6,8
	Nr. 4	0,1	2,1	0,2	22,7
	Nr. 6	1,4	2,4	0,7	2,2

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	4	4	4	4
Spearman r	0,8000	0,2108	-0,8000	-0,1054
P value (two-tailed)	0,3333	0,9167	0,3333	0,9167
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
3d	Nr. 1	2,7	4,8	0,5	
	Nr. 4	0,3	2,3	0,2	3,6
	Nr. 5	0,9	1,9	0,2	5,4
	Nr. 6	0,9	3,1	0,7	4,1

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	4	4	3	4
Spearman r	0,6325	0,5000	0,8660	0,7379
P value (two-tailed)	0,4167	0,4167	0,3333	0,3333
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
4d	Nr. 1	1,8	5	0,1	
	Nr. 3	2,2	5	0,9	6,4
	Nr. 4	0,3	2,9	0,5	11,3
	Nr. 5	0,3	1,8	0,2	5,6

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	4	4	3	4
Spearman r	0,8889	0,3162	0,0000	0,1054
P value (two-tailed)	0,0833	0,7500	1,0000	0,9167
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
5d	Nr. 2	2,3	1,9	0,1	3,7
	Nr. 4	0,3	3,7	0,5	3,9
	Nr. 5	0,4	4,8	0,6	2,8
	Nr. 6	0,5	0,1	0,1	1,8

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	4	4	4	4
Spearman r	-0,6000	-0,7379	-0,4000	0,9487
P value (two-tailed)	0,4167	0,3333	0,7500	0,0833
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

Zeit	Patient	CD 133	c-kit	bcrp-1	CXCR4
6d	Nr. 1	2,4	1,9	0,6	8,2
	Nr. 3	1	5,6	0,2	5,3
	Nr. 4	0,2	2,1	0,1	5,7
	Nr. 5	0,8	2,2	0,8	4,3
	Nr. 6	0,9	4,2	0,7	4,6

Korrelation nach Spearman	CD133-c-kit	CD133-bcrp-1	CD133-CXCR4	c-kit-bcrp-1
Number of XY Pairs	5	5	5	5
Spearman r	0,0000	0,1000	0,4000	0,1000
P value (two-tailed)	1,0500	0,9500	0,5167	0,9500
P value summary	ns	ns	ns	ns
Exact or approximate P value?	Exact	Exact	Exact	Exact
Is the correlation significant? (alpha=0.05)	No	No	No	No

9.1.3 Tabellen der statistischen Daten (zu Kapitel 5.1.7)

Zeit	Gruppe	Patient	CD 133 ⁺ /45 ⁺	Gruppe	CD 133 ⁺ /45 ⁺
prä OP	LR	Nr. 1	3,1	gesund	0,6
	LR	Nr. 2	5	gesund	0,5
	LR	Nr. 4	0,6	gesund	0,4
	LR	Nr. 5	1,3	gesund	0,1
	LR	Nr. 6	1,3	gesund	0,1
	12h	LR	Nr. 1	5,7	gesund
LR		Nr. 2	5	gesund	0,2
LR		Nr. 3	1,1	gesund	0,7
LR		Nr. 4	1		
LR		Nr. 5	1,3		
LR		Nr. 6	0,6		

Mann-Whitney U-Test: 0,882834312

(LR prä OP gegen 12h post OP)

Mann-Whitney U-Test: 0,01056737

(LR prä OP gegen gesunde Probanden)

prä OP	LLS	10,6
	LLS	3,1
	LLS	12,1
	LLS	1,7
	LLS	12,5
	LLS	0,5
	LLS	0,3
	LLS	0,1
	LLS	0,5
	LLS	0,1
	LLS	0,1
12h	LLS	19,6
	LLS	20,4
	LLS	50,1
	LLS	6,9
	LLS	50,5
	LLS	50,1
	LLS	5,6
	LLS	42,4
	LLS	27,8
	LLS	33,7
	LLS	45,7

Mann-Whitney U-Test: 3,92041E-05

(LR gegen LLS)

<0,0001

9.2 Tabellen zu Ergebnissen des Colony Assays (zu Kapitel 5.2)

Daten zu Abbildung 5.23

Kulturtag:	Patient	BFU-E	CFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM	CFU-M	CFU-G	CFU-EC-like
präoperativ	Nr. 7	0	8	0	0	1	2	2
	Nr. 8	0	9	0	1	0	4	0
	Nr. 9	0	12	0	2	4	1	5
	Nr. 10	0	11	0	0	0	1	2
	Nr. 11	0	9	0	2	2	0	3
	MW	0	9,8	0	1	1,4	1,6	2,4
	SEM	0	0,735	0	0,447	0,748	0,678	0,812

Kulturtag:	Patient	BFU-E	CFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM	CFU-M	CFU-G	CFU-EC-like
12 Stunden	Nr. 7	0	3	0	0	0	0	0
	Nr. 8	0	29	0	0	1	4	5
	Nr. 9	0	12	1	1	7	1	3
	Nr. 10	0	5	0	0	0	0	0
	Nr. 11	0	8	0	2	1	2	1
	MW	0	11,4	0,2	0,6	1,8	1,4	1,8
	SEM	0	4,654	0,2	0,4	1,319	0,748	0,969

Daten zu Abbildung 5.24

Kulturtag:	Spender	BFU-E	CFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM	CFU-M	CFU-G	CFU-EC-like
präoperativ	Nr. 1	0	9	0	0	1	2	2
	Nr. 2	0	5	0	0	4	1	0
	Nr. 3	0	13	0	0	0	7	0
	Nr. 4	0	6	0	0	1	2	2
	Nr. 5	0	8	0	2	1	3	1
	MW	0	8,2	0	0,4	1,4	3	1
	SEM	0	1,393	0	0,4	0,678	1,049	0,447

Kulturtag:	Spender	BFU-E	CFU-E	CFU-GEMM	CFU-GM	CFU-M	CFU-G	CFU-EC-like
12 Stunden	Nr. 1	0	22	0	0	10	0	0
	Nr. 2	0	22	1	1	6	6	3
	Nr. 3	0	57	0	0	3	5	0
	Nr. 4	0	1	0	3	7	0	0
	Nr. 5	0	13	0	0	15	0	0
	MW	0	23	0,2	0,8	8,2	2,2	0,6
	SEM	0	9,333	0,2	0,583	2,035	1,356	0,6

Daten zu Abbildung 5.26

Kulturtag: prä OP	Patient	echte CFU	atypische CFU-EC	CFU-M-like
	Nr. 7	1	0	0
	Nr. 8	0	0	0
	Nr. 9	0	0	0
	Nr. 10	0	0	0
	Nr. 11	0	0	6
	MW	0,2	0	1,2
	SEM	0,2	0	1,2

Kulturtag: 12h	Patient	echte CFU	atypische CFU-EC	CFU-M-like
	Nr. 7	0	0	0
	Nr. 8	0	0	1
	Nr. 9	1	0	0
	Nr. 10	0	0	0
	Nr. 11	0	0	0
	MW	0,2	0	0,2
	SEM	0,2	0	0,2

Daten zu Abbildung 5.27

Kulturtag: prä OP	Spender	echte CFU	atypische CFU-EC	CFU-M-like
	Nr. 1	0	0	0
	Nr. 2	1	0	1
	Nr. 3	1	0	0
	Nr. 4	0	0	0
	Nr. 5	2	1	0
	MW	0,8	0,2	0,2
	SEM	0,374	0,2	0,2

Kulturtag: 12h	Spender	echte CFU	atypische CFU-EC	CFU-M-like
	Nr. 1	0	0	0
	Nr. 2	0	0	10
	Nr. 3	0	7	7
	Nr. 4	0	0	25
	Nr. 5	0	0	1
	MW	0	1,4	8,6
	SEM	0	1,4	4,501

Daten zu Abbildung 5.29

Patienten mit Lebererkrankungen

Kulturtag: prä OP	Patient	hämatopoetischer Ansatz	endothelialer Ansatz
	Nr. 7	13	1
	Nr. 8	14	0
	Nr. 9	24	0
	Nr. 10	14	0
	Nr. 11	16	6
	MW	16,2	1,4
	SEM	2,01	1,166

Kulturtag: 12h	Patient	hämatopoetischer Ansatz	endothelialer Ansatz
	Nr. 7	3	0
	Nr. 8	39	1
	Nr. 9	25	1
	Nr. 10	5	0
	Nr. 11	14	0
	MW	17,2	0,4
	SEM	6,696	0,245

Leberlebendspender

Kulturtag: prä OP	Spender	hämatopoetischer Ansatz	endothelialer Ansatz
	Nr. 1	14	0
	Nr. 2	10	2
	Nr. 3	20	1
	Nr. 4	11	0
	Nr. 5	15	3
	MW	14	1,2
	SEM	1,761	0,583

Kulturtag: 12h	Spender	hämatopoetischer Ansatz	endothelialer Ansatz
	Nr. 1	32	0
	Nr. 2	28	10
	Nr. 3	65	14
	Nr. 4	11	25
	Nr. 5	28	1
	MW	32,8	10
	SEM	8,828	4,593

9.3 Genehmigung von Becton Dickinson GmbH bzgl. Abbildung 4.1

Sehr geehrte Frau Münster,

vielen Dank für den Link: <http://genome.tugraz.at/GrundlBiomTechnik/FACS.pdf>

gerne räumen wir Ihnen das Recht ein, unsere Fotos für folgenden Zweck zu nutzen:

Abdruck in Ihrer Dissertation

Unsere Fotos unterliegen dem Copyright und dürfen nur in Verbindung einer Quellenangabe (mit den korrekten Produkt-/Markennamen) benutzt werden.

Eine Weitergabe der Fotos an Dritte bedarf der Zustimmung von BD. Ebenso die Verwendung für einen anderen als den o.g. Zweck.

Besten Dank für die Einhaltung unserer Copyright-Vorschriften.

Mit freundlichen Grüßen

Christina Borlein

Christina Borlein
Marketing Assistant

BD Biosciences
Tullastraße 8-12, 69126 Heidelberg, Germany
tel: + 49 (0) 6221 - 305 240 fax: +49 (0) 6221 - 303 798
E-mail: christina_borlein@europe.bd.com Website: www.bd.com

9.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Alice Münster