UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

I. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Zentrums für Innere Medizin

Direktor: Prof. Dr. med. Ansgar W. Lohse

Evaluierung neuer Strategien zur Steigerung der Repopulationseffizienz xenogen transplantierter Hepatozyten im Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) Maussystem

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Michael König
aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 16.10.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Maura Dandri

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. Lutz Fischer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Gisa Tiegs

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN 5

1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG 6

2 EINLEITUNG 7

2.1 Hepatozytentransplantation 7

2.2 Kinetik der Integration und Repopulation von transplantierten Hepatozyten nach intrasplenaler Transplantation 8

2.3 Methoden zur Erhöhung der Repopulationsrate nach Hepatozytentransplantation 9

2.4 Das Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) Mausmodell 10

2.5 Allogene und xenogene Transplantationen in transgene Mäuse und murine Infektionsmodelle 11

3 MATERIAL UND METHODEN 15

3.1 Material 15
3.1.1 Reagenzien/ Substanzen 15
3.1.2 Erstellen der Stammlösungen 18
3.1.3 Hybridisierungsprimer für LightCycler PCR 20
3.1.4 Primärantikörper 20
3.1.5 Sekundärantikörper (mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt) 22

3.2 Geräte und Werkstoffe 22

3.3 Tiere und Tierhaltung 24
3.3.1 Tierversuchsgenehmigungen 24
3.3.2 Herkunft und Haltung der Tiere 24
3.3.3 Genotypisierung der Mäuse 25

3.4 Handhabung der xenogenen Hepatozyten 25
3.4.1 Isolierung von Tupaia belangeri Hepatozyten 25
3.4.2 Isolierung von humanen Hepatozyten 26
3.4.3 Kryokonservierung der humanen Hepatozyten 27
3.4.4 Auftauen der humanen Hepatozyten 27
3.4.5 Transplantation von xenogenen (Human oder Tupaia) Hepatozyten in uPA-Mäuse 27
3.4.6 Explantation der Mauslebern 28

3.5 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben 28
3.5.1 Kryofixierung 28
3.5.2 Kryoschnitte 28
3.5.3 Immunhistochemische Standardfärbungen 29
3.5.4 Immunfluoreszenzfärbungen 31
3.5.5 Fotodokumentation 32
3.5.6 Berechnung der Repopulationsraten 32
3.5.7 Elektronenmikroskopie 33

3.6 Molekularbiologische Methoden 34
3.6.1 Westernblot zum Nachweis der Repopulation mit Tupaia- und Humanhepatozyten 34
3.6.2 DNA Aufreinigung für LightCycler Messung 36
3.6.3 DNA-Quantifizierung 36
3.6.4 LightCycler Messverfahren 38

4 ERGEBNISSE 40

4.1 Etablierung der LightCycler Messung zur Quantifizierung von transplantierten humanen Hepatozyten im uPA-Maussystem 40

4.2 Kurzzeitanalyse der Integration von frisch isolierten humanen Hepatozyten nach Transplantation in das uPA-Maussystem 42

4.3 Langzeitanalyse der Integration von frisch isolierten humanen Hepatozyten nach Transplantation in das uPA-Maussystem 44

4.4 Analyse der Integration von frisch isolierten Tupaiahepatozyten und Vergleich mit den Ergebnissen der humanen Hepatozyten 50

4.5 Einfluss von Clodronat zur Steigerung der Repopulationseffizienz 54

5 DISKUSSION 59

5.1 Kinetik des Engraftments von Human- und Tupajahepatozyten 59

6 ZUSAMMENFASSUNG 63

7 LITERATURVERZEICHNIS 64

DANKSAGUNG 67

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 68

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua dest	Aqua destillata
BSA	Bovines Serum Albumin
CK18	Cytokeratin 18
DAPI	4‘,6-Diamidino-2-Phenylimdol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPIV	Dipeptidylpeptidase IV
DTT	Dithiothreitol
EGTA	Ethylene glycol tertaacetic acid
FBS	Fetales bovines Serum
HBV	Hepatitis B-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HH	Humane Hepatozyten
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HNF 4	Hepatocyte nuclear factor 4
LC	LightCycler
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
RAG 2	Recombination Activating Gene 2
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium)
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disease
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
Tx	Transplantation
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator
UW	University of Wisconsin
WHV	Woodchuck Hepatitis-Virus
WM-HBV	Wolly Monkey Hepatitis B-Virus
ZO-1	Zonula occludens-1

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Studien über Lebermetabolismus und Virushepatitiden benötigen Systeme, die über einen längeren Zeitraum die Zellfunktionen der Hepatozyten aufrechterhalten können. Bei in vitro Modellen dedifferenzieren sich primäre Hepatozyten jedoch rasch. Ein Maussystem hingegen, das erfolgreich mit primären humanen Hepatozyten repopuliert werden kann, würde solche Hindernisse überwinden können. Ein besseres Verständnis über Virus-Wirt-Interaktionen ist notwendig um effizientere antivirale Therapien zu entwickeln. Auch das klinische Potenzial von Hepatozytentransplantationen im Patienten könnte sich dadurch verbessern. Das uPA-Mausmodell ist ein Leberrepopulationsmodell, beruhend auf einer spezifischen hepatozytären Expression vom Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator, welches toxisch für die Maushepatozyten ist. In der Vergangenheit konnte in verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass Leberzellen allogen (Maus), als auch xenogen (Ratte, Woodchuck, Tupaia belangeri und Human) in diese transgenen Mäuse transplantiert werden können. Die transplantierten Fremdhepatozyten sind in der Lage, die murine Empfängerleber bis zu einem gewissen Prozentsatz zu repopulieren, sodass sich eine chimäre Leber entwickelt. Das dauerhafte Überleben der transplantierten Zellen wird dabei durch das Einkreuzen einer immundefizienten Maus ermöglicht. Je nach Spezies der Spenderhepatozyten werden jedoch normalerweise sehr unterschiedliche Repopulationsraten erreicht. Während Woodchuck- und Tupaiahepatozyten Repopulationsraten von bis zu 90 % auch in heterozygoten uPA-Mäusen ermöglichten (1, 2), zeigten die humanen Hepatozyten größere Schwankungen in ihrer Effizienz und niedrigere Repopulationsraten (3). Die Ursachen für diese Unterschiede in heterozygoten uPA-Mäusen sind nicht geklärt. Eine höhere Repopulationsrate mit humanen Hepatozyten ist zurzeit nur mit homozygoten uPA-Mäusen zu erreichen. Zur besseren Charakterisierung des uPA-Mausmodells wurde in der vorliegenden Arbeit eine Kinetik zum Engraftment und zur Integration von transplantierten Human- und Tupaiahepatozyten erstellt. Dabei wurden heterozygote SCID/ uPA-Mäuse entsprechend intrasplenal transplantiert und zu definierten Zeitpunkten post transplantationem, vor allem mittels Immunhistochemie, auf Integration und Funktion der Spenderhepatozyten im Leberparenchym der Maus untersucht. Außerdem wurde evaluiert, ob als zusätzliche Nachweismethode der transplantierten Hepatozyten in der murinen Leber die LightCycler Messung, ein real-time PCR Assay, eingesetzt werden kann. Abschließend wurde untersucht, inwiefern mit der Applikation von in Liposomen verpacktem Clodronat, zur weiteren Unterdrückung der murinen Abstoßungsreaktionen, das Engraftment und die

Integration der transplantierten humanen Hepatozyten in die murine Leber gesteigert werden kann.

2 Einleitung

2.1 Hepatozytentransplantation

Die Lebertransplantation ist heutzutage eine erfolgreiche und gut etablierte Therapie für Patienten mit akutem und chronischem Leberversagen. Allerdings wird die Behandlung durch die bedingte Verfügbarkeit von Spenderorganen deutlich limitiert. Außerdem ist eine Transplantation sehr kostenintensiv und in den meisten Fällen muss eine lange immunsupressive Therapie angeschlossen werden (4). Die Verfügbarkeit von hoch differenzierten frisch isolierten Leberzellen zur Transplantation stellt somit eine attraktive Alternative zur kompletten Organtransplantation dar (5). So werden frisch isolierte normale adulte Hepatozyten bereits vielfach in der Forschung eingesetzt, und klinische Versuche haben bereits ihr Potenzial für therapeutische Applikationen gezeigt (6, 7). Die Zelltransplantation hat dabei im Gegensatz zur vollständigen Organtransplantation folgende Vorteile: Sie ist weniger invasiv, die Zellen von einem Spender können für mehrere Empfänger verwendet werden, die Zellen können kryokonserviert werden, Zellsuspensionen sind weniger immunogen als ein ganzes Organ, und die Prozedur ist kostengünstiger (8). Bislang wird die Leberzelltransplantation jedoch aufgrund von verschiedenen Problemen noch nicht in der klinischen Routine eingesetzt. So kann bislang hierdurch bei akutem bzw. chronischem Leberversagen kein signifikanter Überlebensvorteil nachgewiesen werden. Es konnte lediglich bei leberbedingten Stoffwechselerkrankungen vorübergehend der Stoffwechseldefekt korrigiert werden (9).

Bislang wird die Hepatozytentransplantation vor allem im Tiersystem durchgeführt, um die biologischen Prozesse besser zu analysieren und die klinische Anwendung dieser Technik zu optimieren. So wird die xenogene Hepatozytentransplantation genutzt, um in immundefizienten Mäusen humane Hepatozyten in vivo zu untersuchen (10). Insbesondere der Vorteil, dass transplantierte Hepatozyten im Gegensatz zur Zellkultur ihre Differenzierung behalten und sich mit hepatotropen Viren infizieren lassen, hat zu einem vermehrten Interesse an diesem Kleintiersystem gesorgt (2, 3).

2.2 Kinetik der Integration und Repopulation von transplantierten Hepatozyten nach intrasplenaler Transplantation

In der Vergangenheit wurden verschiedene Transplantationstechniken und -orte in Bezug auf ihre Effektivität und Sicherheit hin untersucht (11). Am häufigsten wird aktuell jedoch in die Milz transplantiert, da sie eine vergleichsweise einfache und sichere Transplantationstechnik mit guten Resultaten in Bezug auf das langfristige Überleben und die gut erhaltenen Stoffwechselaktivitäten der transplantierten Hepatozyten darstellt (12).

Die Integration der transplantierten Hepatozyten wurde erstmalig von Gupta et al. im DPPIV Rattenmodel beschrieben (13). Nach Transplantation von allogenen Hepatozyten in den unteren Milzpol von DPPIV-defizienten Ratten gelangen die Leberzellen zügig mit dem portalen Blutstrom in die Leber. Sie verteilen sich in die Pfortaderäste und gelangen innerhalb von ca. 2 Stunden an den Übergang in die Sinusoide. Aufgrund des Größenunterschiedes zwischen Hepatozyten (20-40 μm) und Sinusoiden (7-9 μm) wird der Großteil der Hepatozyten in den Pfortaderästen reteniert (14). Innerhalb von 24 Stunden post transplantationem integriert sich ein kleiner Anteil in die murine Leberplatte. Der Übertritt aus den Sinusoiden in die Leberplatte wird dabei durch Restrukturierung der Plasmamembranen und der sinusoidalen endothelialen Integrität ermöglicht. Die Mehrzahl der transplantierten Hepatozyten, die sich in den Pfortaderästen befindet, wird innerhalb von 24 Stunden durch das zelluläre Immunsystem eliminiert und ist nicht mehr nachweisbar. Zwischen den ratteneigenen und den integrierten transplantierten Hepatozyten sind 48 Stunden post transplantationem erste gap junctions nachweisbar (13). Während der Injektion der Hepatozyten in die Milz entwickelt sich eine deutliche portale Hypertension, und es kommt zur Bildung von Emboli aufgrund der injizierten Zellmasse. Einen Tag nach Transplantation normalisiert sich der Pfortaderdruck jedoch wieder, da es zu einem rapiden Abtransport der Zellen durch wirtseigene Makrophagen kommt. Der Anteil von erfolgreich integrierten Hepatozyten nach Transplantation ist relativ gering. In früheren Studien zur intrasplenalen Transplantation von Hepatozyten in Tiermodellen wurde gezeigt, dass weniger als 20% der transplantierten Hepatozyten in der Empfängerleber überleben (14, 15).

2.3 Methoden zur Erhöhung der Repopulationsrate nach Hepatozytentransplantation

Um Integrations- und Repopulationsraten nach Hepatozytentransplantation zu erhöhen, wurden in der Vergangenheit verschiedene Modelle entwickelt, die die transplantierten Zellen zur Proliferation stimulieren und ihnen einen Wachstumsvorteil gegenüber den endogenen Hepatozyten ermöglichen sollen. Einerseits lässt sich das durch die Wahl der Transplantationsmethode, andererseits durch die Schädigung der endogenen Leber bzw. der endogenen Hepatozyten ermöglichen. Letzteres ist auf verschiedenen Wegen möglich.

Das Volumen der Leber und die Zellmasse der Hepatozyten scheinen in vivo reguliert zu sein. So regenerieren sich die Lebern von Spendern nach Split-Leberspenden und erreichen nach kurzer Zeit wieder ihre ursprüngliche Größe. Diese Eigenschaft haben sich in der Vergangenheit diverse Arbeitsgruppen zu Nutze gemacht.

So führt die partielle Hepatektomie zu einem Proliferationsstimulus in den transplantierten Zellen (16, 17). Allerdings ist die ursprüngliche Lebermasse bereits nach ein bis zwei Zellteilungen erreicht, sodass der Stimulus nicht lange andauert (18). Außerdem nehmen sowohl die transplantierten als auch die endogenen Hepatozyten an dem Regenerationsprozess teil (19, 20).

Weitere Möglichkeiten bestehen in der chemischen Schädigung der endogenen Hepatozyten wie z.B. durch die Applikation von Retrorsin vor Transplantation. Es handelt sich dabei um ein Alkaloid, das den hepatozytären Zellzyklus blockiert (21, 22). Eine weitere Möglichkeit, die endogenen Hepatozyten toxisch zu schädigen, besteht in der Applikation von einem rekombinanten Adenovirus, der einen Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator exprimiert (23).

Untersuchungen zeigten zudem, dass isolierte Hepatozyten immunogene Eigenschaften besitzen, und insbesondere residente monozytäre Zellen die transplantierten Hepatozyten abräumen. Eine mögliche Methode diese Zellen selektiv vorübergehend zu deletionieren besteht in der Gabe des Bisphosphonates Clodronat. Freies Clodronat ist jedoch nicht in der Lage die Lipiddoppelschicht von Zellen zu überwinden. Rooijen et al. konnten 1984 zeigen, dass Liposomen mit eingekapseltem Clodronat von Makrophagen phagozytiert werden und durch das Clodronat in Apoptose getrieben werden können (24). Auf diesem Wege könnte es möglich sein, die Aktivität der Makrophagen in der Mausleber zu reduzieren. Daher wurde mittels dieser Methode in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob durch die Applikation von

Clodronat eine Erhöhung der Repopulationsraten nach Hepatozytentransplantation durch Deletierung von murinen Makrophagen (Kupfferzellen) möglich ist.
Auch auf genetischer Ebene existieren Schädigungsmodelle wie das transgene Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) Mausmodell, das in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu vielen anderen Studien zur Hepatozytentransplantation in Tieren, die meistens an Ratten durchgeführt wurden bzw. werden, erlauben Mäuse eine weniger kostenintensive und auch einfachere Haltung.

2.4 Das Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator (uPA) Mausmodell

Beim uPA-Mausmodell tragen die Tiere das Transgen Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivator. In uPA-Mäusen sind mehrere Kopien des Transgens unter der Kontrolle eines Albumin Enhancers/ Promoters eingeführt (25, 26) (Abbildung 1 D). Aufgrund der Leberspezifität des Albumin Promotors wird das Transgen ausschließlich in der Leber exprimiert und ist durch die Induktion proteolytischer Schäden im Rauen Endoplasmatischen Retikulum für die transgenen Hepatozyten zytotoxisch. Mikroskopisch zeigen die transgenen Hepatozyten prominente zytoplasmatische Vakuolen mit lipoidem Inhalt, sodass das Lebergewebe im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren makroskopisch weiß erscheint (vgl. Abb. 1A).

Durch somatische intrachromosomale Rekombination kommt es in einzelnen Hepatozyten zu einer Deletion des Transgens. Diese uPA-negativen Zellen besitzen einen starken Wachstumsvorteil und sind in der Lage, die kranken uPA-positiven Hepatozyten zu ersetzen und die Leber vollständig mit uPA-negativen Hepatozyten zu repopulieren. Dieser Prozess unterliegt dem Zufall. In hemizygoten Mäusen kommt es häufiger zur Inaktivierung des Transgens, sodass nach ca. 5 Wochen ein Großteil der Leber mit uPA-negativen Hepatozyten repopuliert wird. Dies ist makroskopisch sichtbar an multiplen rotbraunen Knötchen in der weißen Leber (vgl. Abb. 1 B). In homozygoten uPA-Mäusen ist die Wahrscheinlichkeit deutlich geringer, dass Hepatozyten beide uPA-Allele durch intrachromosomale Rekombination verlieren. Die Leber erscheint daher auch nach 5 Wochen makroskopisch vollständig weiß (vgl. Abb. 1 A).

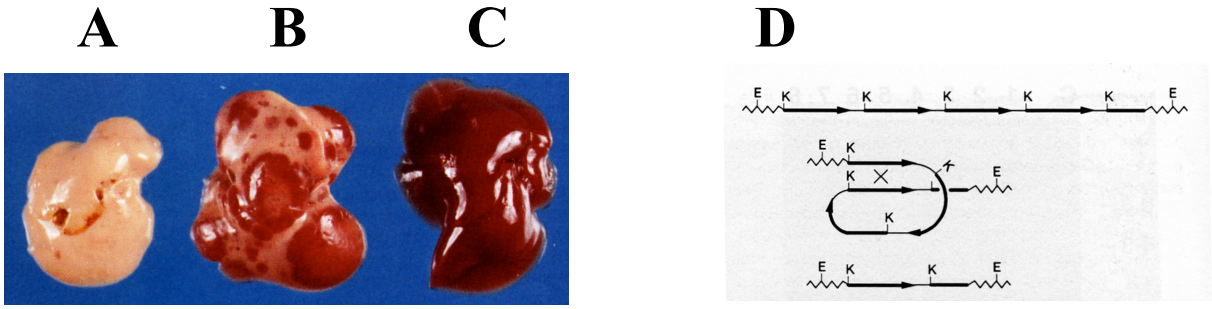


Abbildung 1: A-C: *Albumin-uPA transgene Mauslebern von 5 Wochen alten männlichen Mäusen.*
A: *Homozygote transgene Mausleber. Die Leber ist aufgrund des hepatotoxischen Transgens gleichmäßig hell gefärbt.* ***B:*** *Hemizygote transgene Mausleber. Partiell regenerierte Leber mit hellen, weißen Arealen und multiplen rotbraune Knötchen, die der Farbe von gesundem Lebergewebe entsprechen.* ***C:*** *Nicht transgene Kontrollmausleber (Modifiziert nach Sandgren, Cell 1991, 245-256).*
D: *Mögliche somatische intrachromosomale Rekombination mit Deletion des uPA-Transgens. Das Transgen ist als Pfeil, der Albumin Enhancer/ Promoter als dünne Linie und die murine genomische DNA als Wellenlinie dargestellt. (Modifiziert nach Sandgren, Cell 1991, 245-256)*

2.5 Allogene und xenogene Transplantationen in transgene Mäuse und murine Infektionsmodelle

Rhim et al. konnten 1994 zeigen, dass gesunde Hepatozyten erwachsener Mäuse, die in transgene Mäuse allogen transplantiert wurden, ebenfalls einen starken Selektionsvorteil besitzen und so bis zu 80 % der Empfängerlebern repopulieren konnten (27). Diese Erkenntnisse demonstrierten das enorme Wachstums- und Regenerationspotential von reifen Hepatozyten.

Um dieses Leberregenerationsmodell auch für xenogene Zelltransplantationen nutzbar zu machen, wurden die uPA-Tiere von verschiedenen Arbeitsgruppen mit immunsupprimierten Mauslinien gekreuzt.

So konnten Rhim et al. 1995 zeigen, dass uPA-transgene Mäuse gekreuzt mit Nacktmäusen erfolgreich mit Rattenhepatozyten transplantiert werden konnten (28). Die transgenen Lebern homozygoter Nacktmäuse wurden vollständig mit den Rattenhepatozyten regeneriert und ähnelten den Lebern gesunder Kontrollmäuse in Farbe, Form und Größe.

Petersen et al. gelang 1998 die xenogene Transplantation von Woodchuckhepatozyten in hemizygote uPA/ RAG 2-Mäuse die eine Repopulation von bis zu 90 % der transgenen

immundefizienten Mausleber ermöglichten (1). Die Tiere konnten mit Woodchuckhepatitisvirus (WHV) infiziert werden und zeigten eine WHV-Replikation über mindestens 10 Monate. Aufgrund der fehlenden B- und T-Lymphozyten (29) und der daraus resultierenden fehlenden inflammatorischen Immunantwort konnte eine persistierende, nicht zytotoxische Infektion der Woodchuckhepatozyten in uPA/ RAG 2 chimären Mauslebern beobachtet werden.

Erstmalig konnte von Dandri et al. 2001 gezeigt werden, dass frisch isolierte humane Hepatozyten erfolgreich intraspenal in hemizygote uPA/ RAG 2-Mäuse transplantiert werden können (3). Bis zu 15 % der transgenen Mausleber wurde mit humanen Hepatozyten repopuliert. Die Mäuse wurden anschließend in vivo mit humanem Hepatitis-B Virus (HBV) infiziert. Nach 8 Wochen konnte im Serum humanes Albumin und zirkulierende HBV-Viruspartikel nachgewiesen werden und zeigten damit eine gut erhaltene Funktion und Differenzierung der repopulierenden humanen Hepatozyten an. So konnte an diesem Mausmodell erstmals demonstriert werden, dass gesunde humane Hepatozyten in der Lage sind, in xenogenem Lebergewebe zu wachsen, sich hoch zu differenzieren und die Mausleber teilweise zu repopulieren. Erstmals stand damit ein Mausmodell für HBV in vivo Studien zur Verfügung.

Mercer et al. transplantierten 2001 erstmals frisch isolierte humane Hepatozyten intrasplenal in homozygote SCID-/ uPA-Mäuse und infizierten diese anschließend erfolgreich mit humanem Hepatitis C-Virus (HCV) (30). Dabei konnte ein bis zu 35 Wochen andauernder Virustiter nachgewiesen werden. Außerdem konnten Seren infizierter chimärer SCID/ uPA-Mäuse in gesunde chimäre SCID-/ uPA-Mäuse injiziert werden, die daraufhin ebenfalls einen Virustiter entwickelten.

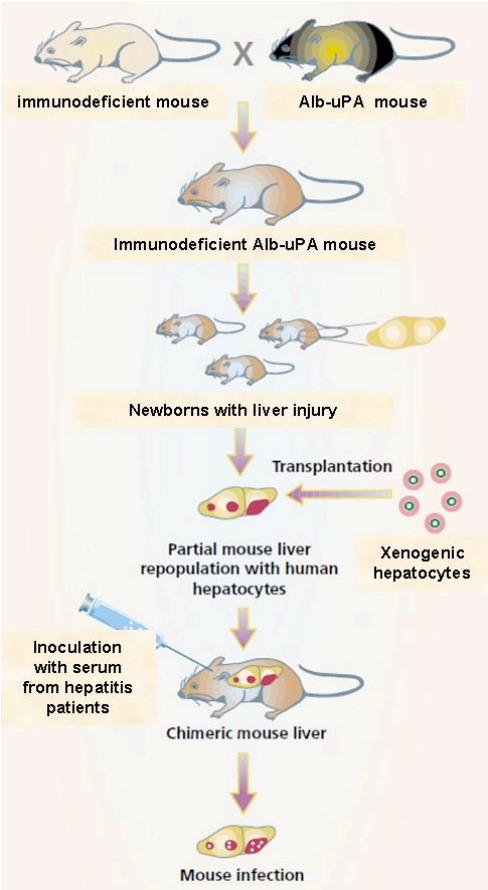


Abbildung 2: *Schema zur Kreuzung von uPA- mit immundefizienten Mäusen, anschließender Transplantation xenogener Hepatozyten (Ratte, Woodchuck, Human) und abschließender Infektion mit Hepatitisviren (WHV, HBV, HCV). (Modifiziert nach Fausto (31))*

Mit den transplantierten humanen Hepatozyten war jedoch lediglich eine geringe und unzuverlässige Repopulation der murinen Leber möglich. Zur Untersuchung des HBV können daher alternativ Hepatozyten des Spitzhörnchens Tupaia belangeri eingesetzt werden (vgl. Abb. 3). So konnten Dandri et al. 2005 erstmals frisch isolierte und auch kryokonservierte Hepatozyten von Tupaia belangeri intrasplenal in uPA/ RAG 2-Mäuse transplantieren und mit humanem HBV und Woolly Monkey HBV (WM-HBV) infizieren (2). Dabei konnten Repopulationsraten von bis zu 80 % erreicht werden, im Gegensatz zu den 15 % mit transplantierten humanen Hepatozyten. Zuvor konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden, dass Tupaiahepatozyten in vitro als auch in vivo mit HBV und WM-HBV infizierbar sind (32, 33).

Abbildung 3: *Tupaia belangeri.*

Das südostasiatische Spitzhörnchen Tupaia belangeri ist ein dem Eichhörnchen ähnliches Säugetier, das phylogenetisch mit Primaten verwandt ist (34). Es gehört zur Ordnung der Scandentia und zur Familie der Tupaiidae, die 18 Arten umfasst, die in Süd- und Südostasien heimisch sind.

Ziel der Arbeit war es nun, die Kinetik zum Engraftment und zur Integration von transplantierten Human- und Tupaiahepatozyten zu vergleichen um zu verstehen, welche Faktoren wichtig sind um höhere Repopulationsraten zu erreichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Reagenzien/ Substanzen

Reagenzbezeichnung	Hersteller
2-Methylbutan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton	Biesterfeld Chemiedistribution GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Albumin	DADE Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Alkohol, Ethanol 99,9 % absolut	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Alpha-D-Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Antikörperverdünnungslösung	Dako, Glostrup, Dänemark
Aqua dest.	Laboreigene Aufbereitungsanlage
Aquatex	Merck, Darmstadt, Deutschland
Atropin	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Bovines Serum Albumin 10 g	DADE Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland
Butanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
$CaCl_2$	Merck, Darmstadt, Deutschland
Clodronat-Liposomen	N. van Rooijen, Amsterdam, Niederlande
D-Glucose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DAPI Hoechst 33258 (bis-benzimide)	Molecular Probes, Oregon, USA
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DTT	Roche Diagnostics Corporation, IN, USA
DNeasy® Blood & Tissue Kit – DNeasy Mini Spin Columns (colorless) in 2 ml Collection Tubes – Collection Tubes (2 ml) – Buffer ATL – Buffer AL	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland

– Buffer AW1 (concentrate) – Buffer AW2 (concentrate) – Buffer AE – Proteinase K	
Doppelfärbekit EnVision – DAB+ Substratbuffer – DAB+ Chromogen – Doublestainblock – Fast Red Substratbuffer – Labelled Polymer-AP – Labelled Polymer-HRP – Fast Red Chromogen Tablets	Dako, Glostrup, Dänemark
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Apotheke Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland
Fetales bovines Serum Albumin	Gemini, Calabasas, Kalifornien
Fluorescent Mounting Medium	Dako, Glostrup, Dänemark
Formaldehyd 16 % (Methanol free) ultra pure Em Grade, 10 ml Brechfläschchen	Polysciences Inc., Warrington, USA
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
H_2O, steril, PCR grade	Gibco, Invitrogen, Kalifornien, USA
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
HCL	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hepatocyte wash medium	Gibco, Invitrogen, Kalifornien, USA
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Isopentan (2-Methylbutan)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
KCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin	Graeub AG, Bern, Schweiz
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagenase Typ 1	Worthington Biochemical Sorporation, NY, USA

Levamisole Endogenous Alkaline Phosphatase Inhibitor	Dako, Glostrup, Dänemark
Light cycler control kit – Beta-Globin Hybridization Probe Mix (10x), LicghtCycler Red_{640} – Beta-Globin Primer Mix (10x) [5µM] – H_2O, steril, PCR grade – Human genomic DNA [15ng/µl], template for control reaction – LightCycler DNA Master Hybridization Probes – $MgCl_2$ stock solution, 25 mM	Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA
LightCycler-DNA Master Hybridization Probes	Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA
Master Pure complete DNA/RNA	Fa. Epicentre, Madison, WI, USA über Fa. Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, Niederlande
Mikrotubes „Safe-Lock micro test tubes”	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Milchpulver	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
NaCl	J.T. Backer, Deventer, Niederlande
NaH_2PO_4-H_2O	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS, 0,01 M phosphate buffered saline: NaCl 0,138M, KCl 0,0027M, pH 7,4	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit, 2-1000ng - Quant-iT dsDNA BR reagent - Quant-iT dsDNA BR buffer - Quant-iT dsDNA BR standard #1 - Quant-iT dsDNA BR standard #2	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit - Extraction Solution - Tissue Preparation Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

- Neutralization Solution B - REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix	
Roswell Park Memorial Institute Medium	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Rotiphorese Sequenziergel 40 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sodium Dodecyl Sulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
SuperSingnal West Dura Chemiliminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20)	Dako, Glostrup, Niederlande
Temed (Tetramethylethylendiamin)	Promega, Madison, USA
Tissue-Tek	Sakura Finetek Staufen, Deutschland
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	Gibco, Invitrogen, Kalifornien, USA
Tween	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
University of Wisconsin solution	Dupont, Wallington, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt, Deutschland

3.1.2 Erstellen der Stammlösungen

BSA 1 %

1g auf 100 ml TBST (0,05% Tween)

$CaCl_2$ Lösung:

14 g $CaCl_2$ werden in 500 ml Aqua dest. gelöst und dann die Lösung steril filtriert.

Citratpuffer

2,94 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat wurden mit 1 l Aqua dest. gemischt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

EGTA-Stammlösung

Zu 100 ml 10 x Leffert´s Stammpuffer werden 900 ml Aqua dest. und 1,9 g EGTA gegeben. Die Lösung wird mit 1 N HCL auf pH 7,4 eingestellt und steril filtriert.

Formaldehydlösung 4 %
2 x 10 ml Formaldehyd 16 % (Brechfläschchen) wurden in 60 ml PBS in der Färbeküvette angemischt.

Hanks Lösung (1 L):
Hepes 100 mM, 3,57 g, KCl 0,4 g, NaCl 8 g, Na_2HPO_4 (hyd.) 0,06 g, KH_2PO_4 0,06 g
Mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und anschließend steril filtriert.

Leffert's Stammpuffer (1 L, 10 x)

23,83 g	HEPES
2,24 g	KCl
75,87 g	NaCl
1,38 g	NaH_2PO_4-H_2O
18,02 g	alpha-D-Glucose

1x Leffert's Lösung
50 ml 10x Leffert's Stammlösung werden mit H_20 auf 500 ml gebracht, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt und steril filtriert.

Erstellen der Pufferlösungen für den Western Blot

Laufpuffer:
Tris 15g, Glycin 72g, SDS (10%) 50ml
ad aqua 1L

Sample Puffer:
4 x SDS Puffer, 1 x DTT (1 M)

SDS Puffer (100 ml, 2 x)
Tris/ HCL 1M pH 6.8 15,5 ml, SDS (10 %) 5 ml, Bromophenol blue 0,25 g, Glycerol 25 ml, ad aqua 100 ml

Transferpuffer:
Tris 3 g, Glycin 14,4 g, MeOH 200 ml
ad aqua 1L

3.1.3 Hybridisierungsprimer für LightCycler PCR

Humanes ß-Globin

PC03	5'- ACACAACTGTGTTCACTAGC - 3'
PC04	5'- CAACTTCATCCACGTTCACC - 3'
CTW LC RED 705	5′ - AAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAA - 3′
CTW FL	5′ - CAAACAGACACCATGGTGCACCTGACTCCTGAGGA - 3′

Tupaia ß-Actin

M1	5′ - AAC GAG ATG AGA TTG GCA - 3′
M2	5′ - CAA TCC AAG TCC TCG GC - 3′
Tup ß-Actin FL	5′ - GGTGACAGCAGTCGCAGT - 3′
LC RED 640	5′- GTTGAAGCGAGCATCCCTAGAGTTCTG - 3′

3.1.4 Primärantikörper

Antigen	Firma/Klon	Fixierung Kryoschnitt in	Verdünnung	Lösungs-medium*
Albumin Mouse anti-human	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland HAS-11	Aceton, 10 Min., -20°C	1/ 1000	TBST/ PBS
CD 81	BD Farmington	Aceton, 10 Min., -20°C	1/1000	PBS
CK 18 Mouse anti-human	Dako, Glostrup, Niederlande/ DC10	Aceton, 10 Min., - 20°C	1/ 100	TBST/ PBS
Connexin 32 Goat anti-human	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA	Aceton, 10 Min., -20°C	1/ 100	PBS
Glutamin-synthetase	BD Transduction	Aceton, 10 Min., -20°C	1/500	TBST/ PBS

DAPI Hoechst 33258 (bis-benzimide)	Molecular Probes, Oregon, USA	Aceton, 10 Min., -20°C *oder auch* Formaldehyd 4 %, 5 Min., RT	1/ 2000	TBST/ PBS
Hämatoxylin Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	Aceton, 10 Min., -20°C *oder auch* Formaldehyd 4 %, 5 Min., RT	1/ 1	-
HNF-4 alpha Goat anti-human	Santa Cruz Biotechnology, USA	Aceton, 10 Min., -20°C	1/ 100	PBS
Ki 67 Mouse anti-human	Dako, Glostrup, Dänemark, Mib-1	1. Formaldehyd 4%, 5 Min., RT. 2. Aceton, 15 Sek., -20°C	1/ 50	TBST/ PBS
Lamin B Rezeptor	Epitomics	Aceton	1/50	TBST/ PBS
P450, Rabbit anti-human	MBL International	Aceton	1/ 50	TBST/ PBS
PCNA Mouse anti-human	Cell Signaling Clon PC10	1. Formaldehyd 4%, 5 Min., RT. 2. Aceton, 15 Sek., -20°C	1/1000	TBST/ PBS
Phalloidin	Molecular Probes, Oregon, USA	1. Formaldehyd 4%, 5 Min., RT. 2. Aceton, 15 Sek., -20°C	1/50	TBST/ PBS
ZO-1, Rabbit anti human	Invitrogen	Aceton	1/100	PBS

** Das angegebene Medium gilt für die einzelnen Waschschritte im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen. Bei Immunfluoreszenzfärbungen wurde es auch als Verdünnungsmedium zum Anmischen des Primärantikörpers verwendet. Für die Standardfärbungen wurde zum Anmischen die Antikörperverdünnungslösung Levamisole Endogenous Alkaline Phosphatase Inhibitor von Dako verwendet.*

3.1.5 Sekundärantikörper (mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt)

Antigen	Firma	Verdünnung
Anti-fluorescein Oregon Green (rabbit)	Alexa Fluor	1/ 200
Donkey anti-goat	Alexa Fluor 546	1/ 400
Donkey anti-goat	Alexa Fluor 633	1/ 400
Donkey anti-mouse	Alexa Fluor 488	1/ 400
Donkey anti-rat	Alexa Fluor 488	1/ 400
Goat anti-mouse	Alexa Fluor 633	1/ 400
Goat anti-mouse	Alexa Fluor 546	1/ 800
Goat anti-rabbit	Alexa Fluor 546	1/ 800
Goat anti-rabbit	Alexa Fluor 633	1/ 400
Goat anti-rat	Alexa Fluor 546	1/ 800

3.2 Geräte und Werkstoffe

Gerätebezeichnung	Hersteller
Akku-Pipette	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Antirollplatte Glas 70 mm	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Bild-Scanner	Canon, Tokio, Japan
Chirurgische Klammern	Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA
Deckgläser	Marienfeld Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland
Färbeküvetten	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fluoreszenz Mikroskop - Axiovert CL	Zeiss, München, Deutschland
Gewebehomogenisator - Tissue grinder tight	Wheaton Industries Inc., Millville, USA
Glaswaren	Schott, Mainz, Deutschland
Handschuhe - Safe Skin Satin Plus	Kimberley-Clark, Zaventem, Belgien
Kamera - Power Shot A95	Canon, Tokio, Japan

Kryostat 2800 Frigocut-N	Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
Laserdrucker: LaserJet	Hewlett Packard, Palo Alto, Kalifornien, USA
LightCycler capillaries (20µl)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
LightCycler Instrument 1.5	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Mikroskope	Zeiss, Göttingen, Deutschland Olympus, Tokio, Japan
Mikrotom-Klingen	Feather, Osaka, Japan
Mikrotubes „Safe-Lock micro test tubes"1,5/ 2,0 mL	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nunc Cryo Tube ™ Vials (1ml)	Nalgene Nunc International, Roskilde, Dänemark
Objektträger Super Frost/ Plus	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland
PCR-Maschine	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PCR-Tubes	Sarsted, Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Wiss.Techn.Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Pipetten Pipetman 2,10,20,100,200,1000 µl	Gilson Medical, Middleton, USA
Pipettenspitze Falcon® für Akku-Pipette	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
Pipettenspitzen - 1000µl, 200µl, 20µl - 10µl Biosphere Filter Tips	Nerbe plus, Winsen/Luhe Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Präzisionswischtücher Kimtech Science	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Reagenzglasschüttler (Vortexer)	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Qubit™ Quantitation Fluorometer	Invitrogen Cooperation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Thermomixer compact	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge - Centrifuge 5415R	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge - Centrifuge 5417C	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasserbad, Typ 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH,

	Burgwedel, Deutschland

Computerprogramme

Bildbearbeitung	Adobe Fotoshop 9 Microsoft Power Point 2003
Textverarbeitung	Microsoft Word 2003
Fotografie der histologischen Bilder	AxioVision LE AC V 4.5.0.0, Carl Zeiss Vision GmbH, München, Deutschland. Canon Utilities Remote Capture Canon Utilities Zoom Browser EX 5.5, Version 5.5.0.190
LightCycler	LightCycler Software Version 3.5 Idaho Technology Inc.1996/ Roche Diagnostics GmbH 1999

3.3 Tiere und Tierhaltung

3.3.1 Tierversuchsgenehmigungen

Die im Laufe der Dissertation durchgeführten Tierversuche wurden bei der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Hansestadt Hamburg beantragt und genehmigt. Die Betäubung und Operation der Tiere fand unter der Aufsicht von Dr. med. Marc Lütgehetmann statt.

Genehmigungsnummern mit Ausstellungsdatum zur Durchführung der Tierversuche:

- Isolation primärer Tupaia belangeri (Spitzenhörnchen) Hepatozyten: A6/341 (23.02.2008)
- Scid beige Mäuse: 43/06 (14.07.2006) , 65/06 (18.08.2006)

3.3.2 Herkunft und Haltung der Tiere

- Tupaia belangeri (Spitzhörnchen): Deutsches Primatenzentrum Göttingen, Deutschland (in Kooperation mit Prof. Dr. Eberhard Fuchs). Die Spitzhörnchen werden dort speziell für Tierversuche gezüchtet.
- uPA Mäuse: Jackson Laboratories, Maine, USA

Alle transgenen Mäuse wurden in IVC (individually ventilated cages) Gestellen der Firma Techniplast unter keimfreien Bedingungen gehalten.

3.3.3 Genotypisierung der Mäuse

Alle Mäuse wurden vor Transplantation mit xenogenen Hepatozyten mittels PCR auf das Vorhandensein des uPA-Transgens untersucht. Dafür wurde aus Schwanzbiopsaten die Maus-DNA isoliert. Es wurde das REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit von Sigma-Aldrich verwendet.

- Mastermix 1: Pro Biopsieprobe 100µl Extraction Solution und 25µl Tissue Preparation Solution
- Bei RT 10 Min. inkubieren
- Bei 95°C für 3 Min. auf dem Thermomixer inkubieren
- 100µl Neutralization Solution B pro Probe hinzugeben, anschließend mixen
- Lagerung bei 4°C oder unmittelbare Verwendung in der PCR
- Anmischen Mastermix 2: 5µl H_2O, 1µl Primer, 10µl REDExtract-N-Amp PCR Reaction Mix
- 4µl Tissue Extract zum Mastermix 2 hinzufügen (Totalvolumen: 20µl)
- Genotypisierungs-PCR
- Gelelektrophorese

3.4 Handhabung der xenogenen Hepatozyten

3.4.1 Isolierung von Tupaia belangeri Hepatozyten

Die Zellisolation und Narkose der Tiere wurden von Herrn Dr. Marc Lütgehetmann in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Die Tupaias wurden mit einer intramuskulären Injektion von 16 mg Ketamin, 0,75 mg Xylazin und 3 µg Atropin pro 100g Tiergewicht narkotisiert (35). Die Desinfektion des OP-Gebietes erfolgte mit 70%-iger Ethanollösung. Nach ventraler Längslaparotomie wurde unmittelbar unterhalb des Leberhilus die Pfortader ligiert und kanüliert. Mit einer Flussrate von 20 ml/ Min. wurde die Leber zunächst für 5 Minuten mit 5 mM EGTA enthaltener Hanks Lösung, und dann für 10 Minuten mit 5 mM $CaCl_2$ und 0,5 mg/ ml Kollagenase enthaltener

Hanks Lösung perfundiert. Nach Explantation der Leber wurde das Organ mechanisch mit Skalpell und Spatel zerkleinert. Die dabei entstandene Suspension wurde anschließend auf eine Filtrationseinheit aufgetragen (Maschengröße 100 µm). Über dreimalige differentielle Zentrifugation (4 min., 360 rpm) bei 4°C wurden nun die Hepatozyten von den anderen Zellen getrennt. Dabei wurde in den ersten beiden Zentrifugationsschritten zur Resuspension RPMI Medium, im letzten Schritt PBS eingesetzt.

3.4.2 Isolierung von humanen Hepatozyten

Die Präparation von menschlichen Leberzellen wurde von der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg unter der Bearbeitungsnummer OB-001/07 vom 08.02.2007 genehmigt.

Hauptquelle der humanen Hepatozyten waren einerseits tumorfreie Resektionsränder von Patienten mit Lebermetastasen sowie Lebergewebe, die aufgrund von traumatischen Läsionen für Transplantationen abgelehnt wurden (3). Die Patienten waren alle seronegativ für HBV, HCV und HIV-serologische Marker. Isolierte Hepatozyten wurden auf das Fehlen von spezifischer HBV-DNA mittels PCR untersucht. Die Spenderlebern wurden vor Explantation in situ mit 4°C kalter University Wisconsin Lösung perfundiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Im Falle von Tumorresektaten wurde ein Keil aus dem resezierten Leberlappen mit einem Mindestabstand von 3 cm zur Metastase reseziert. Die warme Ischämiezeit variierte zwischen 90 Minuten bis 4 Stunden. Unmittelbar nach der Exstirpation wurde das Lebergewebe auf Eis mit eiskalter University Wisconsin Lösung über mehrere Katheter, in den Gefäßen der Schnittfläche liegend, perfundiert. Anschließend wurden die humanen Hepatozyten mit Kollagenasen isoliert. Dafür wurde die Pfortader kanüliert, und die Leber bzw. das Lebersegment wurden auf einer sterilen Glasplatte im 37°C warmen Wasserbad für 5 Minuten mit Präperfusionslösung perfundiert (Leffert's Puffer: 10 mmol/l HEPES, 3 mmol/l KCL, 130 mmol/l NaCl, 1 mmol/l NaH_2PO_4-H_2O, 10 mmol/l Glucose [pH 7,4] mit 5 mmol/l EGTA). Die Durchflussrate betrug 100 ml/ min. Anschließend wurden die Lebern mit Leffert's Puffer ohne EGTA für 3 bis 5 Minuten perfundiert. Danach wurden die Lebergewebe mit Kollagenase Puffer perfundiert (Leffert's Puffer mit 5 mmol/l $CaCL_2$ und 0,05% Kollagenase Typ 1). Je nach Gewebegröße variierte die Perfusionszeit zwischen 10 bis 30 Minuten. Das digerierte Lebergewebe wurde in 4°C kalter Leffert´s Puffer unter Hinzufügen von 5 mmol/L $CaCl_2$ platziert. Nach Eröffnung der Leberkapsel wurden die Zellen herausgelöst und mit einem 100-µm Nylonfilter gefiltert. Um die Hepatozyten von den nichtparenchymatösen Zellen zu trennen, wurden die

Zellsuspensionen dreimal zentrifugiert (50g für 5 Min.). Die Vitalität der Hepatozyten wurde durch die Trypanblau-Färbung verifiziert.
Bei den Transplantationsveruchen mit frisch isolierten humanen Hepatozyten wurden direkt nach Isolation 5 x 10^5 dieser Hepatozyten in 50µl PBS resuspendiert und anschließend in die Versuchstiere intrasplenal injiziert.

3.4.3 Kryokonservierung der humanen Hepatozyten

Die frisch isolierten humanen Hepatozyten wurden in einer Konzentration von 5 x 10^6 Zellen/ ml in einer eiskalten Pufferlösung, bestehend aus 70% UW, 20% FBS und 10% DMSO, suspendiert und vermischt. Nach 2 bis 5-minütiger Lagerung auf Eis wurden die Zellsuspensionen in gekühlte Tubes transferiert und direkt im Gefrierschrank auf -70°C kryokonserviert. Nach 16 bis 24 Stunden wurden sie zur weiteren Lagerung in flüssigen Stickstoff eingetaucht (36).

3.4.4 Auftauen der humanen Hepatozyten

Zum Auftauen der frisch isolierten humanen Hepatozyten wurden die gefrorenen Tubes direkt in ein 37°C warmes Wasserbad überführt bis das Eis aufgetaut war. Sofort nach dem Auftauen wurden die Tubes auf Eis gelagert. Um den Anteil der Pufferlösung (UW, FBS und DMSO) in den Zellsuspensionen stufenweise zu verringern, wurde eiskaltes RPMI schrittweise hinzugefügt. So wurden in 5-Minuten Intervallen 0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml pro Milliliter der Zellsuspension hinzugefügt, sodass die DMSO Konzentration abschließend 2 % betrug. Zum Entfernen des Einfriermediums wurden die Zellen zentrifugiert (50 g für 5 Minuten, 4°C), und der Überstand wurde verworfen. Mit einer Konzentration von 1 x 10^6 vitalen Zellen in Suspension mit 50 µl PBS konnten die humanen Hepatozyten nun in die Versuchstiere intrasplenal injiziert werden.

3.4.5 Transplantation von xenogenen (Human oder Tupaia) Hepatozyten in uPA-Mäuse

18 bis 24 Tage alte Mäuse wurden mit der o.g. intramuskulären Injektion von Ketamin, Xylazin und Atropin narkotisiert (siehe 3.4.1) (35). Die Mäuse wurden rechtsseitig gelagert und linksseitig mit 70%igem Ethanol steril abgewaschen. Anschließend erfolgte linkslateral unterhalb des Thorax die Laparotomie mit einem ca. 0,5 cm langen Querschnitt. Die

erhaltene Öffnung wurde dann solange über dem Peritoneum verschoben bis die Milz zu erkennen war. Im nächsten Schnitt erfolgte die Eröffnung des Peritoneums, sodass die Milz mit einer anatomischen Pinzette partiell aus der Bauchhöhle hervorluxiert werden konnte. Nach Ligatur der Milz an ihrem distalen Pol wurden 50 µL der aufgereinigten xenogenen Zellsuspension (10^6 Zellen) mit einer 1 ml gasdichten Hamilton Spritze und einer 30 G/ 45° Kanüle in die Milz durch die Ligatur hindurch injiziert. Die Ligatur wurde zugezogen und die Milz wieder in die Bauchhöhle zurück verlagert. Anschließend erfolgte die Peritonealnaht und Klammerung der Haut mit chirurgischen Klammern. Nach abgeschlossener Wundheilung konnten die Klammern ca. eine Woche post transplantationem wieder entfernt werden.

3.4.6 Explantation der Mauslebern

Zu den verschiedenen Zeitpunkten (vgl. Abschnitt 4.2 bis 4.4) wurden pro Versuchsgruppe jeweils 3 Tiere sakrifiziert. Die Mäuse wurden dabei zuerst mittels CO_2 narkotisiert und dann durch zervikale Dislokation getötet. Nach ventraler Längslaparotomie erfolgte die Präparation der Lebern. Dabei wurden die Lebervenen sowie die Pfortader abgesetzt und die Lebern aus dem rechten Oberbauch herausgelöst. Zur Gewinnung von Serumproben erfolgte die Thorakotomie mit Inzision des Herzens und anschließend die Aspiration des Blutes mit einer Spritze.

3.5 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben

3.5.1 Kryofixierung

Die Gewebefragmente wurden direkt nach Entnahme in TissueTek eingebettet und in mit Trockeneis versetztem Isopentan eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei –80°C.

3.5.2 Kryoschnitte

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte am Rotationsmikrotom bei -20°C mit 10 µm Schichtdicke. Sie wurden auf Objektträger aufgebracht und entweder entsprechend dem jeweiligen Färbeprotokoll (siehe Abschnitt 3.5.3 bzw. 3.5.4) unmittelbar fixiert oder unfixiert bei -80°C eingefroren bzw. zur kurzfristigen Lagerung im Waschpuffer (TBST/ PBS) bei 4°C aufbewahrt. Die Lagerung und Aufbewahrung der gefärbten Schnitte erfolgte bei den

immunhistochemischen Standardfärbungen bei RT, bei den Fluoreszenzfärbungen bei 4°C in der Dunkelkammer.

3.5.3 Immunhistochemische Standardfärbungen

Für die immunhistochemischen Standardfärbungen wurde das Doppelfärbekit EnVision von Dako eingesetzt.

** = Hinweis auf die gesonderte Behandlung der Kryoschnitte bei Färbungen gegen Ki 67 oder PCNA.*

Fixierungslösung:

- Aceton bei -20°C

  ** Formaldehyd 4% bei Raumtemperatur (RT)*

Waschpuffer:

TBST oder PBS je nach verwendetem Antikörper (siehe 3.1.4).

Färbeprotokoll:

- Fixierung der Gewebeschnitte in Aceton für 10 Min. bei -20°C.
  ** Fixierung in Formaldehyd 4% für 15 Min. bei RT. Anschl. 15 Sek. Inkubation in Aceton bei RT.*
- Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Die kurzfristige Lagerung für wenige Tage erfolgte in TBST oder PBS bei 4°C. Bei unmittelbarer weiterer Verwendung wurden die Gewebeschnitte für 10 Min. in TBST oder PBS gewaschen und anschließend für 2 x 5 Min. im Citratpuffer gekocht.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Endogene Peroxidaseblockierung: Inkubation mit 6 ml 30 % Wasserstoffperoxid gelöst in 60 ml Methanol für 5 Min.
- Waschschritt: 3 x 5 Min. in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Blockierung: Inkubation in 1% BSA für 30 Min. bei RT.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Primärantikörper mit Antikörperverdünnungslösung *Levamisoule Endogenous Alkaline Phosphatase Inhibitor* verdünnen und auf die Gewebeschnitte flächendeckend auftragen. Inkubation für mind. 1 Stunde bei RT oder für 24 Std. bei 4°C in der Feuchtkammer.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. waschen in TBST/ PBS.

- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Inkubation mit Sekundärantikörper *Labelled Polymer-HRP* für 30 Min. in der Feuchtkammer bei RT.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. waschen in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- 1 ml *DAB+ Substratpuffer* mit 20 µl *DAB+ Chromogen Substrat* mischen und flächendeckend auf die Gewebeschnitte auftragen. Inkubation bis makroskopisch eine Farbreaktion festzustellen ist (ca. 1-3 Min.). Die Farbreaktion mit Aqua dest. stoppen.
- <u>Bei Einfachfärbung:</u>
  Inkubation der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin für ca. 3 Min., anschließend für 10 Min. in Leitungswasser waschen. Eindeckelung mit Aquatex.
  ➔ **Protokollende**

  <u>Bei Doppelfärbung:</u>
  Inkubation mit *Doublestainblock* für 3 Min. bei RT.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. waschen in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Inkubation mit dem 2. Primärantikörper (Vgl. Anwendung des 1. Primärantikörpers s.o.).
- Waschschritt: 3 x 1 Min. waschen in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Inkubation mit dem 2. Sekundärantikörper *Labelled Polymer-AP* für 30 Min. in der Feuchtkammer bei RT.
- Waschschritt: 3 * 1 Min. waschen in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- DAB Färbung: 3 ml *Fast Red Substratpuffer* mit einer Tablette *Fast Red* und 3 Tropfen *Levamisole Endogenous Alkaline Phosphatase Inhibitor* mischen bis die Tablette aufgelöst ist. Inkubation der Gewebeschnitte bis makroskopisch eine Farbreaktion festzustellen ist (ca. 15 – 30 Min.). Die Farbreaktion mit Aqua dest. stoppen.
- Inkubation der Gewebeschnitte mit Hämatoxylin für ca. 3 Min., anschl.10 Min. Inkubation in Leitungswasser. Eindeckeln mit Aquatex.

3.5.4 Immunfluoreszenzfärbungen

** = Hinweis auf die gesonderte Behandlung der Kryoschnitte bei Färbungen gegen Ki 67 und PCNA*

Fixierungslösung:

- Aceton bei -20°C

  ** Formaldehyd 4% bei RT*

Waschpuffer:

- TBST oder PBS je nach verwendetem Antikörper (siehe 3.1.4).

Färbeprotokoll:

- Fixierung der Gewebeschnitte in Aceton für 10 Min. bei -20°C.

  **Fixierung in Formaldehyd 4% für 15 Min. bei RT. Anschl. 15 Sek.Inkubation in Aceton bei RT..*
- Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80°C. Die kurzfristige Lagerung für wenige Tage erfolgte in TBST oder PBS bei 4°C. Bei unmittelbarer weiterer Verwendung wurden die Gewebeschnitte für 10 Min. in TBST oder PBS gewaschen und anschließend für 2 x 5 Min. im Citratpuffer gekocht.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Primärantikörper mit TBST oder PBS gemäß 3.1.4 verdünnen und flächendeckend auf die Gewebeschnitte auftragen. Inkubation für mind. 1 Stunde bei RT oder für 24 Std. bei 4°C in der Feuchtkammer.
- Bei Doppelfärbung:

  Beide Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem gemeinsamen Tube anmischen.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.
- Sekundärantikörper (mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt) mit TBST/ PBS im Verhältnis 1/200 anmischen, flächendeckend auf die Gewebeschnitte auftragen und anschließend für 30 - 45 Min. in dunkler Feuchtkammer inkubieren.

  Bei Doppelfärbung:

  Beide Sekundärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in einem gemeinsamen Tube anmischen.
- Waschschritt: 3 x 1 Min. in TBST/ PBS.
- Entfernung des Waschpuffers mit Präzisionswischtüchern.

- DAPI Kernfärbung: 50 µl DAPI mit TBST oder PBS in einer Färbeküvette anmischen und die Gewebeschnitte für ca.15 – 20 Sek. inkubieren. Eindeckelung mit Fluorescent Mounting Medium.

3.5.5 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation und Digitalisierung der Gewebeschnitte erfolgte am Mikroskop (Zeiss) mittels einer computergesteuerten Kamera (Canon) und dem herstellereigenen Computerprogramm. Als Auswertungssoftware für die Digitalfotos wurde das Programm AxioVision AC V 4.5.0.0. ® von Zeiss verwendet. Hiermit konnten die Messstrecken am Computerbildschirm ausgemessen und in entsprechende Tabellen eingetragen werden. Für die Beurteilung der Repopulationsraten wurden pro Versuchstier 3 orthograd angefertigte Gewebeschnitte untersucht. Jeweils 3 Gesichtsfelder in 10facher Vergrößerung wurden per Zufall ausgewählt und für die Auszählung und Messung digitalisiert. Durch computergestützte Bildanalyse der digitalisierten und CK18 markierten Schnitte konnte die Gesamtfläche der mausfremden Hepatozyten pro Schnitt bestimmt und miteinander ins Verhältnis gesetzt werden. Dadurch erhielt man die relative Leberzelldichte jedes Schnittes. Zusätzlich wurden noch von jedem Schnitt die Anzahl der Hepatozyten-Areale und ihre durchschnittliche Größe durch das Computerprogramm bestimmt.

3.5.6 Berechnung der Repopulationsraten

Jeweils drei digitalisierte Gesichtsfelder wurden bei 10facher Vergrößerung mit dem Computerprogramm ausgemessen. Es erfolgte die Zählung der einzelnen CK18 positiven Zellcluster, die Messung der durchschnittlichen Fläche der einzelnen Cluster, sowie die Messung der Gesamtfläche aller CK 18-positiven Cluster und des gesamten Gewebeschnittes. Die Berechnung der einzelnen Hepatozytenzahl pro Cluster erfolgte nach folgender Formel:

Durchschnittliche Zellclusterfläche / $((26/2)^2 \times PI)$.
$(26/2)^2 \times PI$ entspricht hierbei etwa der Fläche eines Hepatozyten.

Die Berechnung der durchschnittlichen Zellteilung ergab sich als der reelle Logarithmus von der durchschnittlichen Zellclusterfläche zur Basis 2 (LOG_2 (Durchschnittliche Zellclusterfläche)).

Durch das Verhältnis der gesamten Schnittfläche zur Gesamtfläche aller mausfremden Hepatozyten konnten die entsprechenden Repopulationsraten ermittelt werden.

3.5.7 Elektronenmikroskopie

Die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Schumacher (Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, UKE).

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Westernblot zum Nachweis der Repopulation mit Tupaia- und Humanhepatozyten

In regelmäßigen Abständen wurde den uPA-Mäusen während der Versuchszeiträume eine kleine Menge Blut abgenommen. Aus dem Serum konnte dann mittels Westernblot auf humanes Serumalbumin die Repopulationsrate abgeschätzt werden. Somit konnte der Erfolg der Repopulation verfolgt werden, sodass entsprechende Tiere für die Analyse mittels Histologie und LightCycler Messung entnommen wurden.

Trenngel (1,5 mm) x 2	**10% Tupaia**	**12,5% Human**
Acryl (40%)	2,5 ml	3,2 ml
H^2O	5,0 ml	4,3 ml
1.5M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS (Sodium dodecyl sulfat)	100 µl	100 µl
10% APS (Ammoniumpersulfat)*	100µl	100 µl
Temed (Tetramethylethylendiamin) *	10 µl	10 µl

- Mit Butanol überschichten.
- Nach dem Aushärten Butanol abgießen und die Reste mit einem Tuch entfernen.

Sammelgel x 2

Acryl (40%)	500 µl
H_2O	2,6 ml
1 M Tris pH 6,8	500µl
10% SDS	40µl
10% APS*	40µl
Temed*	10µl

** Erst hinzufügen, wenn das Gel ausgehärtet ist.*

Probenvorbereitung:

Tupaia 1:20	**Human 1:50**
3 µl Serum	3 µl Serum
45,6 µl SDS-Puffer	117,5 µl SDS-Puffer
11,4 µl 1M DTT	29,5 µl 1M DTT

- 3 Min. bei 99°C, dann auf RT abkühlen lassen.
- Proben auftragen: - 10 µl Marker (Invitrogen benchmark prestained)
  - 5 µl Kontrolle (Tupaia 0%, 10%, 50%; Human 0%, 0,1%, 1%)
  - 5 µl Probe
- Bei 100 V ca. 2 Stunden inkubieren lassen.
- Semidry Blotting: Zurechtschneiden der PVDF-Membran, kurz in Methanol aktivieren und 4 Blätter Filterpapier pro Membran mit Transferpuffer (20% MeOH) inkubieren.

Anordnung:

Oben
2 Blätter Filterpapier
Gel
PVDF-Membran
2 Blätter Filterpapier
Unten

- Pro Gel 2 Stunden bei 85mA inkubieren.
- Blocken mit TBST (0,5%) und Milchpulver (4°C)
- Primärantikörper 1 Stunde bei RT inkubieren lassen. Human: Albumin; Verdünnung 1: 70 000 in TBST Tupaia: Antitrypsin; Verdünnung 1: 2000 in TBST.
- 3 x 15 Min. waschen mit TBST.
- Zugabe des Sekundärantikörpers anti-Maus HRP mit Verdünnung 1: 70 000 in TBST, und für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubieren.
- 4 x 15 Min waschen mit TBST.
- Zur Signaldetektion 1ml vom SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate® pro Membran für 3 Min. inkubieren lassen.

3.6.2 DNA Aufreinigung für LightCycler Messung

Für die DNA Aufreinigung aus den Leberfragmenten der Versuchstiere wurde das DNeasy Tissue Kit von Quiagen eingesetzt und laut beiliegendem Protokoll für Blut und Gewebe angewendet.

- Pro Gewebeprobe 180 µl Buffer ATL und 20 µl Proteinase K im Tissue Potter anmischen.
- Gewebe mit Schere zerkleinern und anschl. im Tissue Potter mit Tight Stössel zerstoßen.
- Gestösseltes Gemisch in Tube pipettieren (200 µl).
- Auf Heizblock bei 55 °C, 1400 rpm 5 Min. inkubieren.
- 200 µl Buffer AL und 200 µl Ethanol (96 – 100%) für jede Probe anmischen, vortexen.
- Buffer AL/ Ethanol Gemisch pro Probe pipettieren (400 µl), 10 Sek. vortexen.
- Probe in DNeasy Spin Column pipettieren (600 µl).
- 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugieren.
- Spin Column Filter in ein neues Collection Tube umsetzen.
- Pro Probe 500 µl Buffer AW 1 hinzugeben.
- 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugieren.
- Spin Column Filter in ein neues Collection Tube umsetzen.
- Pro Probe 500 µl Buffer AW 2 hinzugeben.
- 3 Min. bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren.
- Spin Column Filter in Eppendorf Tube umsetzen.
- Pro Probe 200 µl Buffer AE hinzufügen und für 1-3 Min. inkubieren.
- 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugieren.
- Wiederholen der letzten beiden Schritte, jedoch nur 100 µl Buffer AE einsetzen.
- Entfernen der Spin Columns.
- Lagerung kurzfristig bei 4 °C, langfristig bei -80 °C.

3.6.3 DNA-Quantifizierung

Für die Quantifizierung der gesamten DNA-Menge (Maus und Human bzw. Tupaia und Human) der aufgereinigten Lebergewebe wurde das Qubit Quantitation Fluorometer mit den Quant-iT Reagenzien von Invitrogen verwendet. In der darauffolgenden LightCycler

Messung, die im nächsten Abschnitt erläutert wird, konnten dann die humanen bzw. die Tupaia Hepatozyten in den Mauslebern quantifiziert werden. Aufgrund der Kenntnis von Gesamt DNA-Menge (Maus und Human bzw. Tupaia und Human) ließ sich dann die Gesamtzellzahl des Lebergewebes errechnen. Es wird dabei ein Genomgewicht von 6 pg pro Zelle postuliert. Es ist davon auszugehen, dass ca. 50 % der Gesamtzellzahl des Lebergewebes den eigentlichen Hepatozyten entsprechen. Diese Anzahl konnte nach der LightCycler Messung, in der spezifisch die humanen Hepatozyten quantifiziert wurden, mit der gesamten Hepatozytenmenge (Maus und Human/ Tupaia) in ein Verhältnis gesetzt werden. Dadurch wurde die Bestimmung der Repopulationsraten möglich.

Es wurde das Quant-iT dsDNA Broad-Range Assay Kit, 2-1000ng von Invitrogen verwendet. Das Messprinzip der Quant-iT Technologie basiert auf umweltsensitiven Farbstoffen, die in wässriger Umgebung wenig fluoreszieren. Sobald sie aber an spezifische Makromoleküle binden, verstärkt sich ihre Fluoreszenz um ein vielfaches. Dadurch wird ein sehr starkes Signal im Gegensatz zu einem schwachen Hintergrund ermöglicht. Das verwendete Quant-iT Broad-Range DNA Assay Kit weist eine linearen Messbereich von 2 bis 1000 ng auf, auch in Anwesenheit von einer vergleichbaren Menge an RNA.

- Vorbereitung von zwei assay tubes für den Standard und jeweils ein assay tube pro Probe (vgl. Abbildung 6).
- Anmischen der Quant-iT Working Solution: Verdünnung der Quant-iT Reagenz 1:200 im Quant-iT Buffer. Das Gesamtvolumen pro Standard bzw. Probe beträgt 200 µl.
- Vorbereitung der assay tubes laut nachstehender Tabelle:

	Standard Assay Tubes	**Probe** Assay Tubes
Volumen der **Working Solution**	190µl	180-199µl
Volumen des **Standards**	10µl	-
Volumen der **Probe**	-	1-20µl
Gesamtvolumen	**200µl**	**200µl**

- Alle tubes für 2-3 Sekunden vortexen und anschließend für 2 Minuten bei RT inkubieren.
- Messung der tubes im Qubit Fluorometer laut Herstellerangaben.

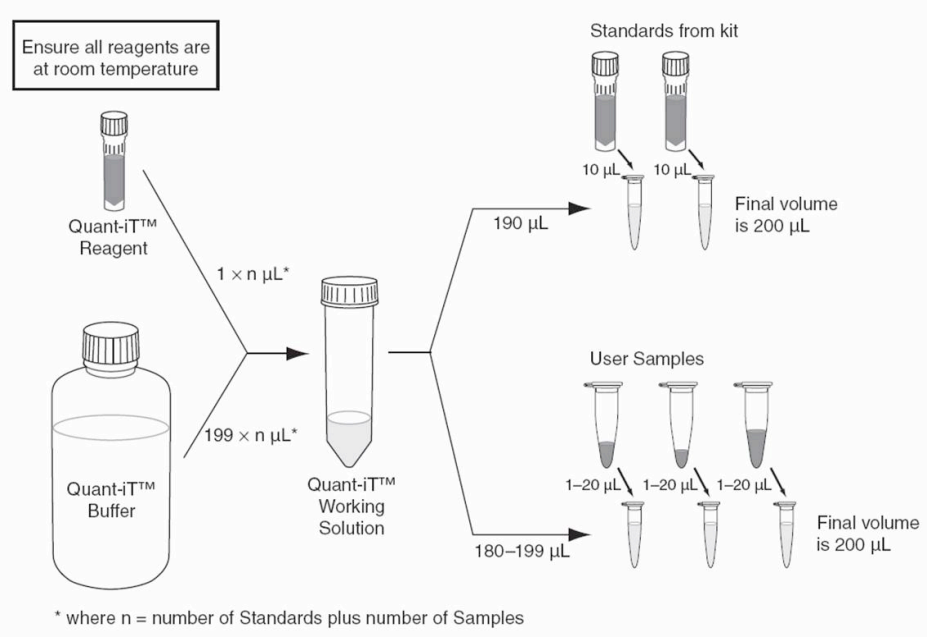


Abbildung 4: *Übersicht zur Vorbereitung der assay tubes. © 2007 Invitrogen Corporation*

3.6.4 LightCycler Messverfahren

Für die quantitative Messung der transplantierten humanen Hepatozyten in den Mäuselebern wurde das LightCycler Control Kit DNA von Roche etabliert. Dabei wurde das ß-Globin-Kit von Roche verwendet (37). Im Folgenden wird der ß-Globin-Lauf erläutert, während die Etablierung dieses Verfahrens zu spezifischen Quantifizierung des humanen Zellanteils in den Mäuselebern im Ergebnisteil (siehe 4.1) vorgestellt wird.

ß-Globin-Lauf

- Herstellung des Mastermixes aus dem Roche ß-Globin-Kit mit folgender Zusammensetzung pro LightCycler-Kapillare:

7,6 µl	H^20
2,4 µl	$MgCl^2$
2 µl	Primer Mix (PCO3/ PCO4)
2 µl	Hybridisierungssonden, Typ 3/ 4
2 µl	Master
16 µl	**Gesamtvolumen Mastermix**

- Jeweils 4 µl Probe wurden mit dem Mastermix vermischt, so dass sich insgesamt 20 µl Reagenz pro Messröhrchen ergaben.
- Zur Erstellung der Standardreihe wurde die im Kit enthaltende Human Genomic DNA mit einer Konzentration von 15 ng/ µl verwendet. Dabei wurden für die erste Verdünnung 4 µl Human Genomic DNA eingesetzt. Für die Standards 2 bis 4 wurde daraus eine Verdünnungsreihe im Verhältnis 1:2 hergestellt. Somit ergaben sich für die Standardreihe folgende Konzentrationen:

Standard	Konzentration	Zellzahl
1	60 ng	10.000
2	6 ng	1.000
3	600 pg	100
4	60 pg	10

- Einsetzen der LightCycler-Kapillaren in den auf 4 °C gekühlten LightCycler-Kapillaren-Adapter.
- Je LightCycler-Kapillare wurden 16 µl Mastermix und 4 µl des Standards bzw. der aufgereinigten Gewebeprobe oder der Negativkontrolle (H^2O, Maus pur) hinzugefügt.
- Nach Verschluss wurden die Messkapillaren, in den gekühlten Adaptern, für 30 Sekunden bei 3000 rpm zentrifugiert.
- Einsetzen der LightCycler-Kapillaren in das LightCycler-Proben-Karussell.
- Messung mit folgendem ß-Globin Programm:

ß-Globin							
Cycles	Target °C	Incubation hrs:min.sec	Temperature transition rate °C/s	Secondary target °C	step size °C	step delay cycles	Aquisition mode
1x denature	95	10:00	20.00	0	0.0	0	NONE
45x amplification	95	10	20.00	0	0.0	0	NONE
	55	10	20.00	0	0.0	0	SINGLE
	72	5	20.00	0	0.0	0	NONE
1x cool	40	30	20.00	0	0.0	0	NONE

Einstellungen des ß-Globin Programms am LightCycler-Gerät

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der LightCycler Messung zur Quantifizierung von transplantierten humanen Hepatozyten im uPA-Maussystem

Damit neben dem histologischen Nachweis der transplantierten Hepatozyten im murinen Lebergewebe ein weiteres objektives Detektionssystem zur Verfügung steht, wurde die LightCycler Messung im Folgenden etabliert. Die Blastsuche ergab zuvor, dass es sich bei dem kommerziell erhältlichen ß-Globin um ein Genprodukt eines single-copy-Gens handelt, das im Human-, nicht jedoch im Mausgenom vorkommt. Das LightCycler Control Kit DNA von Roche wurde dafür zuerst mittels der Erstellung einer Standardreihe aus Zellsuspensionen mit einer definierten Anzahl reiner humaner Hepatozyten getestet. Die Korrelation zwischen der eingesetzten und der im LightCycler berechneten humanen Hepatozytenzahl war hoch signifikant ($p<0.0001$) und mit einem R^2 von 0.998 (Pearson-Korrelation) bestand eine hohe Korrelationsstärke (vgl. Abbildung 5).

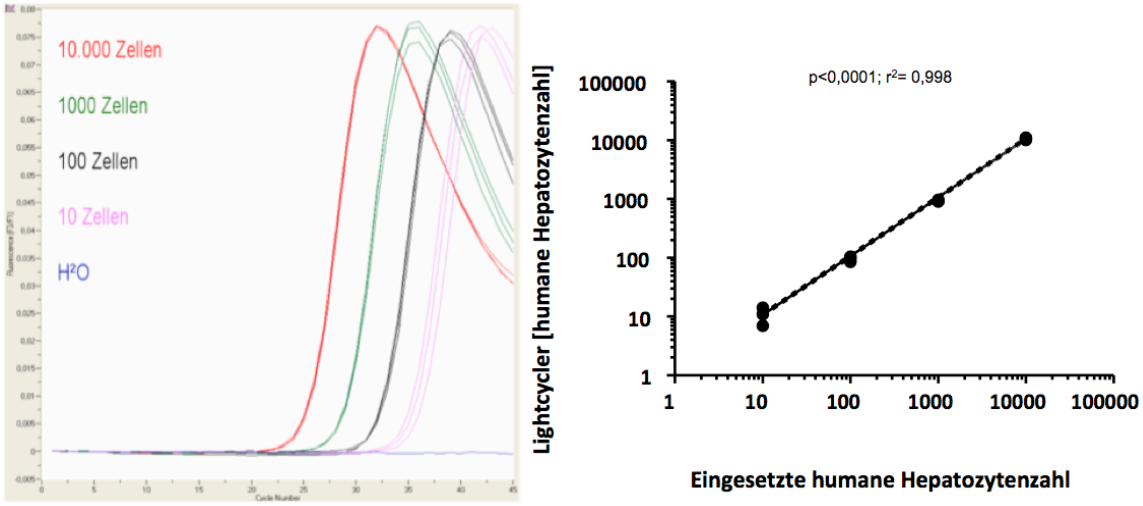


Abbildung 5: *Standardreihe mit reinen humanen Zellsuspensionen. Die Verdünnungen wurden als Triplett angesetzt und entsprechen jeweils 10.000, 1000, 100 und 10 humanen Hepatozyten bei einer postulierten DNA-Menge von 6 pg pro humaner Zelle. H_2O wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Korrelation zwischen der eingesetzten und der in der LightCycler Messung berechneten humanen Hepatozytenzahl war hoch signifikant.*

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob die Anwesenheit von Maus-DNA die Quantifizierung des ß-Globins aus den humanen Hepatozyten beeinflusst. Dafür wurden eigens angesetzte Zellsuspensionen mit einer definierten Anzahl von Human- und Maushepatozyten eingesetzt. Der Anteil der humanen Hepatozyten wurde in einer

Verdünnungsreihe mit jeweils 10.000, 1000, 100 und 10 Zellen angesetzt, während der Anteil der murinen Hepatozyten mit 10.000 Zellen konstant blieb. Als Standardlösungen wurden reine humane Zellsuspensionen ohne murine Hepatozyten analog in einer Verdünnungsreihe angesetzt. Die Korrelation zwischen der eingesetzten und der im LightCycler berechneten humanen Hepatozytenzahl war mit und ohne murine DNA hoch signifikant (beide $p<0.0001$) und mit einem R^2 von 0.995 (Person Korrelation) besteht auch für die Suspension aus murinen und humanen Hepatozyten eine hohe Korrelationsstärke (vgl. Abbildung 6) bei gleichem Slope (1.51 und 1.53).

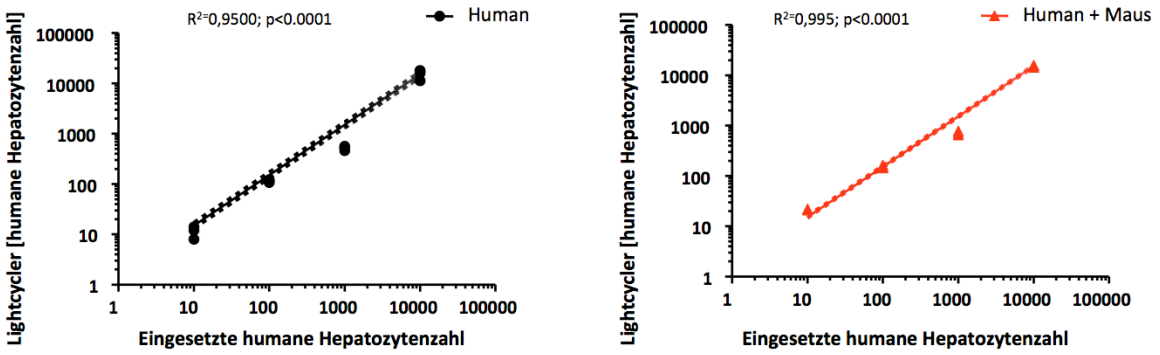


Abbildung 6: *LightCycler Messung mit Standardreihe (reine humane Zellsuspension) und gemischten Zellsuspensionen mit Human- und Maushepatozyten. Der Anteil der Maushepatozyten blieb mit 10.000 Zellen konstant, während der Humanhepatozytenanteil in einer Verdünnungsreihe von 10.000 auf 1000, 100 und 10 Zellen verdünnt wurde. Die Korrelation zwischen der eingesetzten und der im LightCycler berechneten humanen Hepatozytenzahl war mit als auch ohne Mischung mit muriner DNA hoch signifikant.*

Zum Nachweis der transplantierten Tupaja-Hepatozyten im murinen Lebergwebe wurden analog tupaia-spezifische ß-Actin Primer verwendet. Serielle Verdünnungen von definierten Mengen von isolierten Tupajahepatozyten wurden als Standard verwendet (38).

4.2 Kurzzeitanalyse der Integration von frisch isolierten humanen Hepatozyten nach Transplantation in das uPA-Maussystem

Frisch isolierte humane Hepatozyten wurden in uPA-Mäuse via intrasplenaler Injektion transplantiert. Jeweils ca. 1 Mio. Zellen mit einer Vitalität von > 80% wurden hierbei verwendet.

Nach 3 und 24 Stunden wurden aus jeder Gruppe mehrere Tiere sakrifiziert. Das murine Lebergewebe wurde mit der immunhistochemischen Färbung (humanspezifische CK18-Antikörper) und mit der LightCycler Messung auf integrierte humane Hepatozyten (ß-Globin) untersucht.

Nach 3 Stunden konnten in der LightCycler Messung im Median 28 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA (n=4, Range=12-63 Hepatozyten/100ng DNA) nachgewiesen werden. Demnach war nur ein sehr geringer Teil der ursprünglich transplantierten Zellen (1 Mio. Zellen) im murinen Lebergewebe nachweisbar. Nach Ablauf von 24 Stunden war es zu einer deutlichen Reduktion der humanen Zellzahl auf im Median 10 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA (n=3, p=0,057; Range= 8-15 Hepatozyten/100ng DNA) gekommen (vgl. Abb. 7).

Die histologische Auswertung konnte die quantifizierten LightCycler Ergebnisse bestätigen. Auch in dieser Analyse zeigte sich die gleiche Tendenz. Hierfür wurden 3 Gesichtsfelder zufällig ausgewählt. 3 Stunden post transplantationem konnten in der Histologie im Median 23 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld (n=9, Range=10-64 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld) nachgewiesen werden, die in den Pfortaderästen lokalisiert waren (vgl. Abb. 7 A). Somit waren hier nur 0,002 % der ursprünglich transplantierten Zellen (1 Mio. Zellen) im untersuchten murinen Lebergewebe nachweisbar. 24 Stunden post transplantationem konnte eine signifikante Reduktion der humanen Hepatozytenzahl auf im Median 12 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld (n=5, p=0,0195; Range=1-14 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld) beobachtet werden (vgl. Abb. 7).

Die Zellen hatten sich zu diesem Zeitpunkt größtenteils noch nicht in die murine Leberplatte integriert und waren immer noch in den Pfortaderästen der Mauslebern lokalisiert (vgl. Abb. 7 D-F). Die Zellmassen der humanen Hepatozytencluster verlegten

dabei teilweise fast vollständig periphere Pfortaderäste, was partiell zu Nekroseherden in den entsprechenden Versorgungsgebieten der Mausleber führte (vgl. Abb. 7 I).

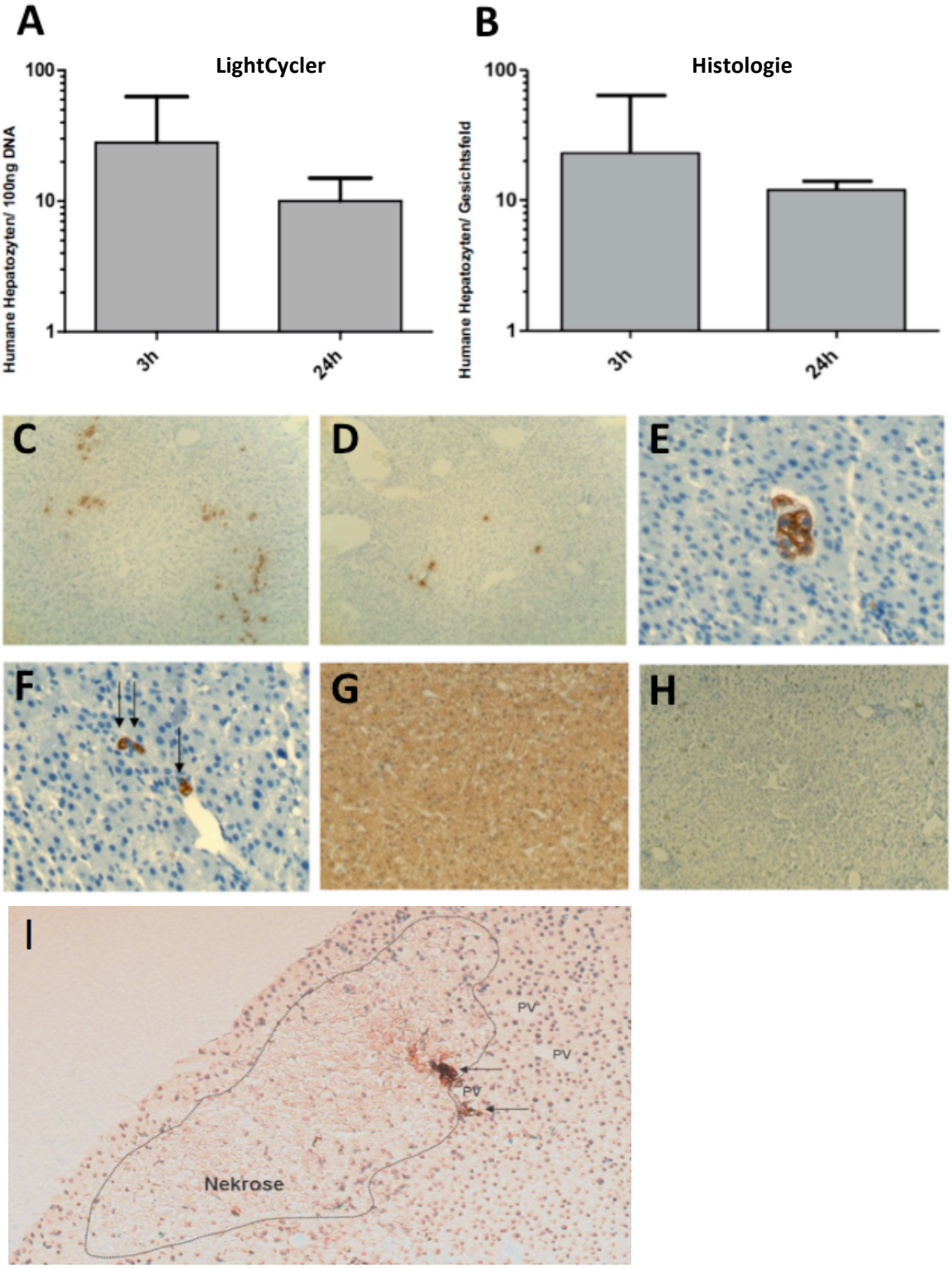


Abbildung 7: A und B: *Sowohl in der LightCycler Messung als auch in der histologischen Analyse kam es nach Ablauf von 24 Stunden post transplantationem zu einer deutlichen Reduktion der humanen Hepatozytenzahl im Vergleich zum Zeitpunkt von 3 Stunden nach Transplantation. In der histologischen Auswertung ist die Reduktion statistisch signifikant.* ***C-I:*** *Immunhistochemische Standardfärbung humanspezifische CK 18-Antikörper (braun) und Hämatoxylin (blau). Z.n. Transplantation mit frisch isolierten humanen Hepatozyten* ***C:*** *3 Stunden post transplantationem. Die transplantierten humanen Hepatozyten sind in den Pfortaderästen lokalisiert. Vergrößerung 10 X.* ***D:*** *24 Stunden post transplantationem. Signifikante Reduktion der humanen Hepatozytenzahl. Vergrößerung 10 X.* ***E:*** *Humanes Hepatozytencluster innerhalb eines Pfortaderastes, der durch die Zellmasse fast vollständig okkludiert wird. 24 Std. post transplantationem. Vergrößerung 20 X.* ***F:*** *Humane Hepatozyten füllen das Lumen eines endständigen kleinen Pfortaderastes vollständig aus (↑↑). Ein Hepatozyt befindet sich am Übergang in die Sinusoide (↑). 24 Std. post transplantationem. Vergrößerung 20 X.* ***G:*** *Positivkontrolle. Humane Leber. Immunhistochemische Standardfärbung CK 18 und Hämatoxylin. Vergrößerung 10 X.* ***H:*** *Negativkontrolle. Mausleber. Immunhistochemische Standardfärbung CK 18 und Hämatoxylin. Der CK 18 Antikörper konnte aufgrund fehlender humaner Zellen keine Bindungen eingehen. Vergrößerung 10 X.* ***I:*** *24 Stunden post transplantationem. Humane Zellcluster füllen das Lumen von peripheren Pfortaderästen teilweise fast vollständig aus und führen in ihrem Versorgungsgebiet zu nekrotischen Veränderungen im murinen Lebergewebe. PV: Portalvenenast. Vergrößerung: 10 X*

4.3 Langzeitanalyse der Integration von frisch isolierten humanen Hepatozyten nach Transplantation in das uPA-Maussystem

Im Langzeitversuch wurden murine Lebergewebe 1 Woche, 1 Monat und 2 Monate nach Transplantation mit frisch isolierten humanen Hepatozyten auf deren Integration in die uPA-Mauslebern untersucht. Aus jeder Gruppe wurden erneut mehrere Tiere sakrifiziert.

Histologisch zeigte sich nach 1 Woche, dass die humanen Hepatozyten sog. Zellcluster bildeten (vgl. Abb. 8 A), die im weiteren Verlauf an Größe zunahmen (vgl. Abb. 8 B), bis sie schließlich miteinander konfluierten (vgl. Abb. 8 C und D). So stieg die humane Hepatozytenzahl pro Cluster kontinuierlich im Verlauf an, während die absolute Clusteranzahl abnahm. Die durchschnittliche Zellzahl, bestimmt in je 3 zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern, zeigte einen Anstieg der humanen Zellzahl 1 Monat, sowie 2 Monate nach Transplantation. Nach einer Woche war die humane Hepatozytenzahl im Vergleich zum 24 Stundenzeitpunkt erneut rückläufig gewesen auf im Median 6 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld (n=4, Range=2-21 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld), um daraufhin 1 Monat nach Transplantation auf im Median 63 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld (n=3, p=0,1536; Range=6-2030 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld), sowie 2 Monate nach Transplantation signifikant auf im Median 1722 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld (n=6, p=0,0095; Range=89-4412 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld) anzusteigen (vgl. Abb. 9 A).

Dieser Verlauf konnte auch unabhängig in der LightCycler Messung größtenteils bestätigt werden. Dort zeigte sich nach der deutlichen Reduktion der humanen Zellzahl innerhalb von 24 Stunden, eine zu den späteren Zeitpunkten signifikant steigende Zellzahl (Kruskal-Wallis p=0,0222, vgl. Abb. 9 B). Im Median waren nach 1 Woche 20 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA (n=2, Range=18-21 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA), und nach 1 Monat 123 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA (n=3, Range=113-1952 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA) nachweisbar. 2 Monate nach Transplantation sanken die humanen Zellzahlen wieder auf im Median 106 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA (n=4, Range=28-271 humane Hepatozyten/ 100 ng DNA).
Unter der Annahme, dass die Mehrzahl der humanen Zellcluster monoklonal ist, haben die humanen Hepatozyten zum 2 Monatszeitpunkt somit jeweils mindestens 6 bis 8 Zellteilungen durchlaufen (vgl. Abb. 9 C).

In der PCNA-Färbung zur Detektion von proliferativer Aktivität konnte zu den frühen Zeitpunkten nach Transplantation in den humanen Hepatozyten deutliche proliferative Aktivität nachgewiesen werden. Nach 3 und 24 Stunden waren so ca. 34% der histologisch nachweisbaren humanen Hepatozyten/ Gesichtsfeld PCNA-positiv (vgl. Abb. 9 D). Dadurch ist es zu Zellteilungen gekommen, sodass sich die Zellcluster stetig vergrößerten, bis sie schließlich miteinander konfluierten (vgl. Abb. 8 A-D). Zu den späteren Zeitpunkten zeigte sich ein Rückgang der proliferativen Aktivität. Somit waren eine Woche post transplantationem ca. 24% der nachweisbaren humanen Hepatozyten/ Gesichtsfeld PCNA-positiv und zum 2 Monats-Zeitpunkt schließlich nur noch 3% der humanen Hepatozyten/ Gesichtsfeld. Auch die Ki 67-Färbung als alternativer Proliferationsmarker bestätigte diese Beobachtungen (vgl. Abb. 8 F-H).

Die ersten humanen Hepatozyten hatten sich 1 Woche nach Transplantation bereits in die murine Leberplatte integriert und konnten im Leberparenchym, in unmittelbarer Nähe zu den Pfortaderästen, nachgewiesen werden (Vgl. Abb. 8 E).

Bei den älteren Tieren aus der 2 Monatsgruppe konnten in den Zellclustern diverse lipomatöse Zelleinschlüsse nachgewiesen werden (vgl. Abb. 8 C). 10 Monate nach Transplantation konnte bei einem Tier eine deutliche entzündliche Immunreaktion in der murinen Leber nachgewiesen werden. So hatten mauseigene monozytäre Zellen bereits damit begonnen die humanen Hepatozyten abzuräumen (vgl. Abb. 8 I).

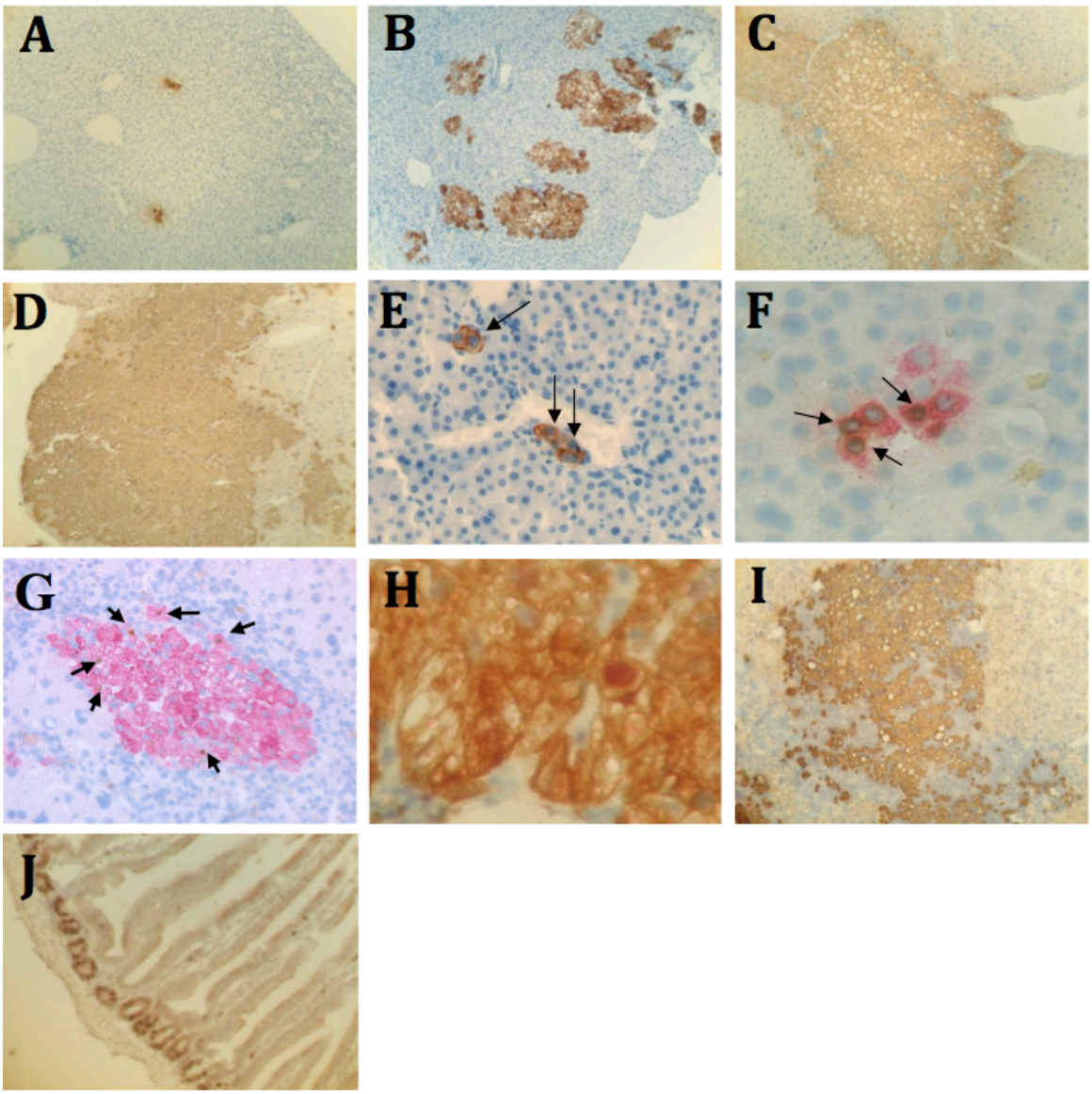


Abbildung 8: A-E: *Immunhistochemische Standardfärbung humanspezifische CK 18-Antikörper (braun) und Hämatoxylin (blau).* ***A:*** *1 Woche post transplantationem. Es lassen sich in diesem Gesichtsfeld 2 humane Zellcluster nachweisen. Vergrößerung 10 X.* ***B:*** *1 Monat post transplantationem. Die Zellcluster haben sich durch die steigende Hepatozytenzahl aufgrund von Zellteilungen vergrößert. Vergrößerung 10 X.* ***C:*** *2 Monate post transplantationem. In diesem Gewebeschnitt hat sich ein großes Zellcluster gebildet, das aus der Konfluation mehrerer einzelner, kleinerer Cluster entstanden ist. Es zeigen sich diverse lipomatöse Zelleinschlüsse. Vergrößerung 10 X.* ***D:*** *10 Monate post transplantationem. Ein großes humanes Zellcluster mit vereinzelt nachweisbaren lipomatösen Zelleinschlüssen. Vergrößerung 10 X.* ***E:*** *1 Woche post transplantationem. Die ersten humanen Zellen haben sich in die Leberplatte integriert und befinden sich in unmittelbarer Nähe zu einem Pfortaderast (↑↑). 2 humane Hepatozyten befinden sich noch in einem peripheren Pfortaderast und okkludieren diesen vollständig (↑). Vergrößerung 20 X.* ***F,*** *G: Immunhistochemische Standardfärbung Zytokeratin 18 (rot), Ki 67 (braun, Pfeile) und Hämatoxylin (blau).* ***F:*** *1 Woche nach Transplantation mit frischen humanen Hepatozyten. Die humanen Hepatozyten sind Ki 67-positiv und weisen somit proliferative Aktivität auf. Vergrößerung 40 X.* ***G:*** *1 Monat nach Transplantation mit frischen humanen Hepatozyten. Auch nach einem Monat können im humanen Zellcluster proliferierende humane Hepatozyten nachgewiesen werden. Vergrößerung 20 X.* ***H:*** *Immunhistochemische Standardfärbung CK 18 (braun), PCNA (rot) und Hämatoxylin (blau). 2 Monate nach Transplantation mit frisch isolierten humanen Hepatozyten. Eine humane Zelle im Gesichtsfeld ist PCNA-positiv. Vergrößerung 40 X.* ***I:*** *Immunhistochemische Standardfärbung Zytokeratin 18 (braun), Hämatoxylin (blau). 10 Monate nach Transplantation mit frisch isolierten humanen Hepatozyten. Deutliche murine Immunreaktion. Mauseigene monozytäre Zellen haben bereits mit der Abräumung der humanen Hepatozyten begonnen. Vergrößerung 10 X.* ***J:*** *Immunhistochemische Standardfärbung PCNA (braun). Positivkontrolle. Mausdarm. Vergrößerung 10 X.*

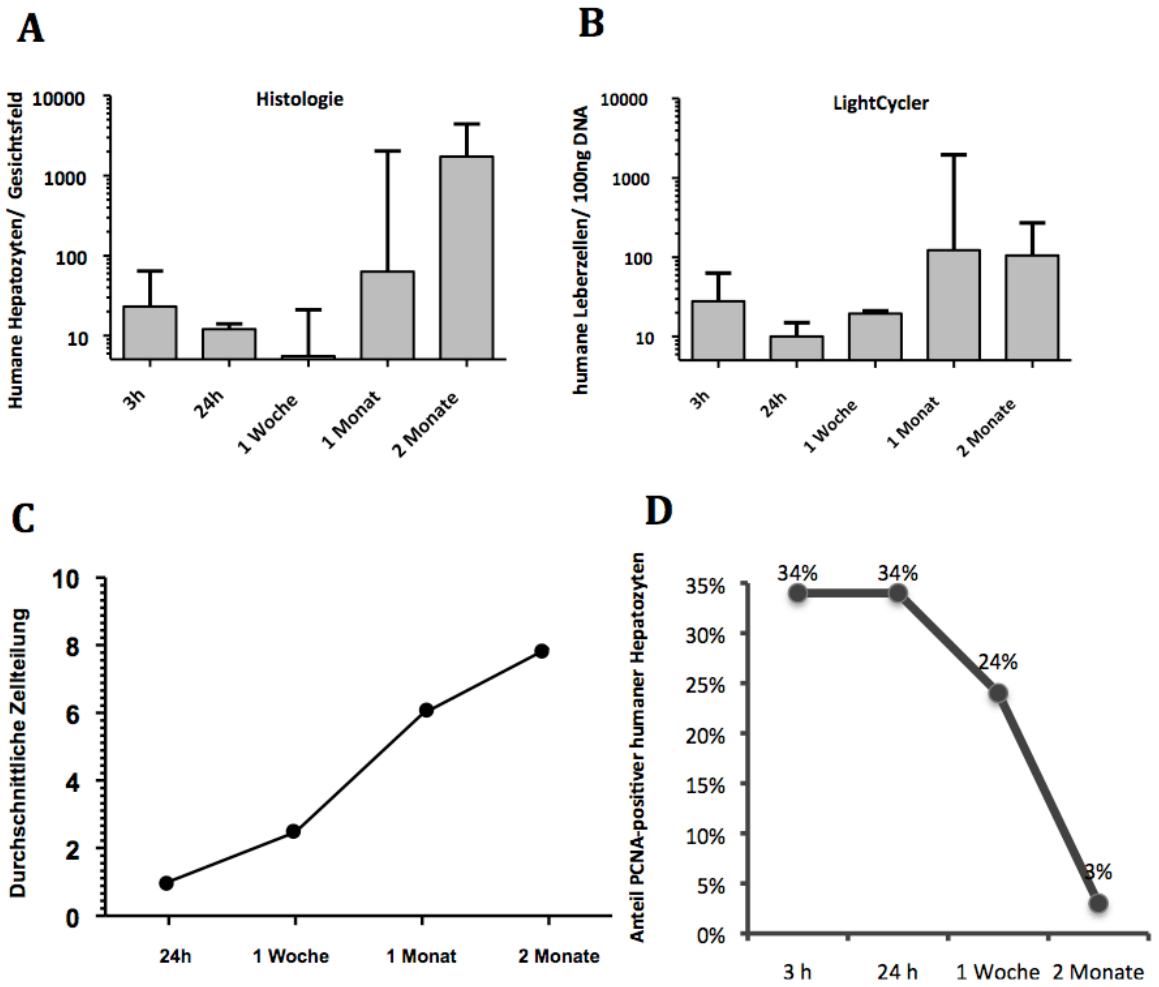


Abbildung 9: A und B: *Humane Hepatozytenzahlen zu den einzelnen Zeitpunkten nach Transplantation. Initial kommt es zu einer deutlichen Reduktion der humanen Hepatozytenanzahl, die im Zeitverlauf wieder signifikant ansteigt. Vergleich zwischen Histologie (A) und LightCycler Messung (B).* ***C:*** *Berechnete durchschnittliche Zellteilung pro Zeitpunkt nach Transplantation. Bei der Annahme, dass die meisten der humanen Zellcluster monoklonal sind, haben die humanen Hepatozyten nach 2 Monaten jeweils mindestens 6 bis 8 Zellteilungen durchgemacht.* ***D:*** *Anteil der PCNA-positiven humanen Hepatozyten/ nachweisbaren humanen Hepatozyten im Gesichtsfeld zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten.*

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen gegen human- und leberspezifische Proteine konnten intakte Zellfunktionen in den humanen Hepatozyten innerhalb des murinen Lebergewebes nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10). Zur Detektion der humanen Zellen wurden Antikörper gegen humanes CK18 und CD81 Protein eingesetzt. Durch Färbung gegen Lamin b, einem Integralprotein der inneren Kernmembran von humanen Zellen, konnte ein erhaltender Zellstoffwechsel in den humanen Zellen beobachtet werden (vgl. Abb. 10 A). Mittels Phalloidin, einem Toxin des Knollenblätterpilzes, konnte das hepatische Zytoskelett der chimären Leber (Maus und Human) dargestellt werden (vgl. Abb 10 B). Der Nachweis des Transkriptionsfaktors HNF 4 in beiden Spezies diente als weiterer Indikator für einen funktionierenden Zellmetabolismus in den murinen und humanen Hepatozyten (vgl. Abb. 10 B). Der Nachweis von leberzellspezifischen Funktionen gelang mit der Detektion von Cytochrom P 450 innerhalb der chimären Leber. Sowohl die murinen Leberzellen als auch die Humanhepatozyten stellten sich als Cytochrom-P 450 positiv dar (vgl. Abb. 10 C). Auch die Glutaminsynthetase, ein eng reguliertes Enzym in perizentralen Hepatozyten, konnte detektiert werden (vgl. Abb. 10 D). Als weiterer Marker für die funktionelle Integration der humanen Hepatozyten in die Mausleber konnten tight- und gap-junctions zwischen den murinen und humanen Hepatozyten nachgewiesen werden. Mittels Antikörper gegen das Zo-1 Protein konnten die tight-junctions in der chimären Leber angefärbt werden. Sowohl zwischen den Hepatozyten der jeweiligen Spezies als auch zwischen den Hepatozyten beider Spezies konnten tight-junctions nachgewiesen werden (vgl. Abb. 10 F). Die Detektion von gap-junctions gelang mit der Färbung gegen Connexin 32 (vgl. Abb. 10 E). Somit bestanden funktionelle Verbindungen zwischen den murinen und humanen Hepatozyten, durch die die Transduktion spezifischer Zellsignale ermöglicht wird. Diese Beobachtungen konnten mittels Elektronenmikroskopie bestätigt werden. So waren Gallencanaliculi zwischen humanen und murinen Hepatozyten nachweisbar, die von tight junctions und Desmosomen flankiert wurden (vgl. Abb. 10 G).

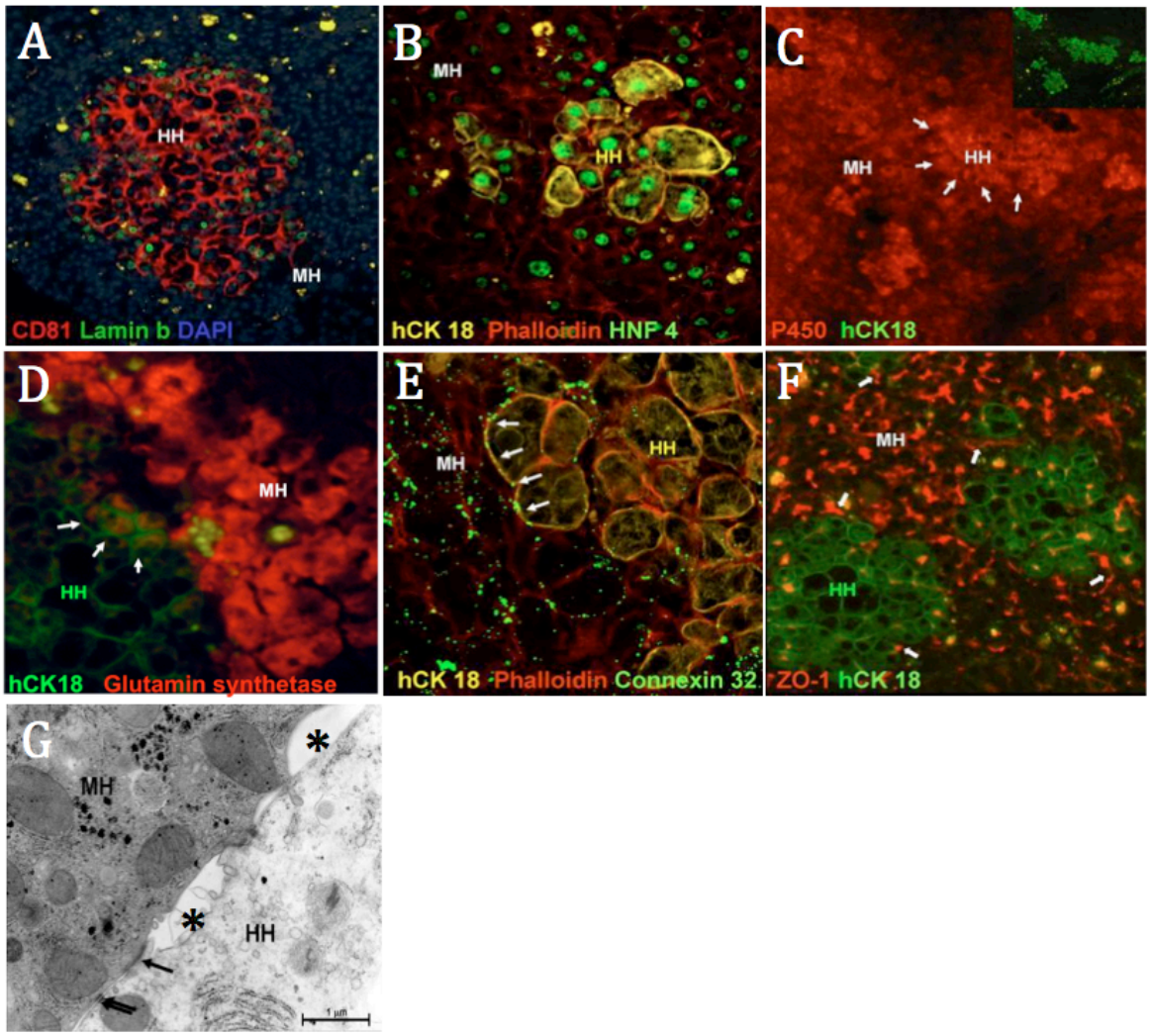


Abbildung 10: A-F: *Immunfluoreszenzfärbungen.*
A: *Färbung gegen humanes CD 81, Lamin b und DAPI-Kernfärbung. Detektion der humanen Hepatozyten mittels CD 81 innerhalb des murinen Lebergewebes. Lamin b ist ein Integralprotein der inneren Kernmembran von humanen Zellen.* ***B:*** *Färbung gegen humanes CK18, Phalloidin und HNF 4. Detektion der humanen Hepatozyten mit CK 18. Mittels Phalloidin läßt sich das intakte hepatische Zytoskelett der chimären Leber (Maus und Human) darstellen. Der Transkriptionsfaktor HNF 4 dient als ein Indikator für einen erhaltenden Stoffwechsel in den Hepatozyten beider Spezies.* ***C:*** *Färbung gegen Cytochrom P 450 (großes Bild) und gegen CK18 (rechter oberer Bildausschnitt). Sowohl die murinen als auch die humanen Hepatozyten sind P 450 positiv und weisen damit auf erhaltene leberspezifische Funktionen der chimären Leber hin.* ***D:*** *Färbung gegen Glutaminsynthetase. Dies ist ein eng reguliertes Enzym in perizentralen Hepazozyten. Die humanen Hepatozyten, die unmittelbar an perizentrale Venen angrenzen sind (schwach) positiv für Glutaminsynthetase (↑).* ***E:*** *Färbung gegen Connexin 32 zum Nachweis von gap junctions zwischen murinen und humanen Hepatozyten als Ausdruck von funktionellen Zellkontakten zwischen den Zellen beider Spezies.* ***F:*** *Färbung gegen das Zo-1 Protein zum Nachweis von tight junctions zwischen den murinen, als auch zwischen den murinen und den humanen Hepatozyten (↑).* ***G:*** *Elektronenmikroskopische Aufnahme von einem humanen und murinen Hepatozyten. Zwischen beiden Zellen sind Gallencanaliculi (*) nachweisbar, die von tight junctions (↑) und Desmosomen (↑↑)* flankiert werden.
HH: Humane Hepatozyten, MH: Maushepatozyten, hCK: humanes Cytokeratin

4.4 Analyse der Integration von frisch isolierten Tupaiahepatozyten und Vergleich mit den Ergebnissen der humanen Hepatozyten

Analog zu der Analyse der Integration von frisch isolierten humanen Hepatozyten in das uPA-Maussystem wurde die Integration von frisch isolierten Tupaiahepatozyten untersucht. Zur intrasplenalen Injektion wurden ebenfalls ca. 1 Mio. Tupaiahepatozyten mit einer Lebensfähigkeit von mindestens 80% verwendet.

Die Mäuse wurden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten - nach 2 Tagen, 1 Woche und 7 Wochen - sakrifiziert.

In der Histologie konnten nach 2 Tagen im Median 19 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld (n=4, Range=10-38 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld) nachgewiesen werden, die in den Pfortaderästen lokalisiert waren (vgl. Abb. 11 A). Somit war, analog zum Versuch mit den humanen Hepatozyten, lediglich ein geringer Anteil der transplantierten Tupaiahepatozyten nach 2 Tagen nachweisbar. Nach einer Woche war es zu einem signifikanten Anstieg der Tupaiazellzahl auf im Median 194 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld (n=9, Range=97-428 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld) gekommen. Auch 7 Wochen nach Transplantation stieg die Zahl der Tupaiahepatozyten weiter signifikant auf im Median 1698 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld (n=6, Range=1027-5772 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld) an.

Die LightCycler Messung konnte die Ergebnisse aus der histologischen Analyse bestätigen. Auch hier konnte 2 Tage nach Transplantation nur ein geringer Anteil der ursprünglich transplantierten Tupaiahepatozyten nachgewiesen werden. So waren nach 2 Tagen im Median 229 Tupaiahepatozyten/ 100 ng DNA (n=4, Range=202-280 Tupaiahepatozyten/ 100 ng DNA) nachweisbar. Nach einer Woche sowie nach 7 Wochen war es analog zur histologischen Analyse zu einem signifikanten Anstieg der Tupaiazellzahl gekommen. So konnten nach einer Woche im Median 548 Tupaiahepatozyten/ 100 ng DNA (n=3, Range=314-600 Tupaiahepatozyten/ 100 ng DNA) und nach 7 Wochen im Median 4732 Tupaiahepatozyten/ 100 ng DNA (n=1) nachgewiesen werden.

Analog zum Versuch mit den humanen Hepatozyten bildeten auch die Tupaiahepatozyten Zellcluster, die im weiteren Zeitverlauf an Größe zunahmen und miteinander konfluierten.

Im Vergleich zu den humanen Hepatozyten waren beim Transplantationsversuch mit den Tupaiahepatozyten jedoch stets deutlich mehr Zellen nachweisbar. Es ließen sich ebenfalls PCNA-positive Tupaiahepatozyten quantifizieren (vgl. Abb. 12 C u. D). So waren nach 2 Tagen 42% und nach 1 Woche bis zu 51 % der pro Gesichtsfeld nachweisbaren Tupaiahepatozyten PCNA-positiv. Nach 7 Wochen ging die proliferative Aktivität deutlich zurück. Im Gegensatz zu den humanen Hepatozyten wiesen die Tupaiahepatozyten keine lipomatösen Zelleinschlüsse auf.

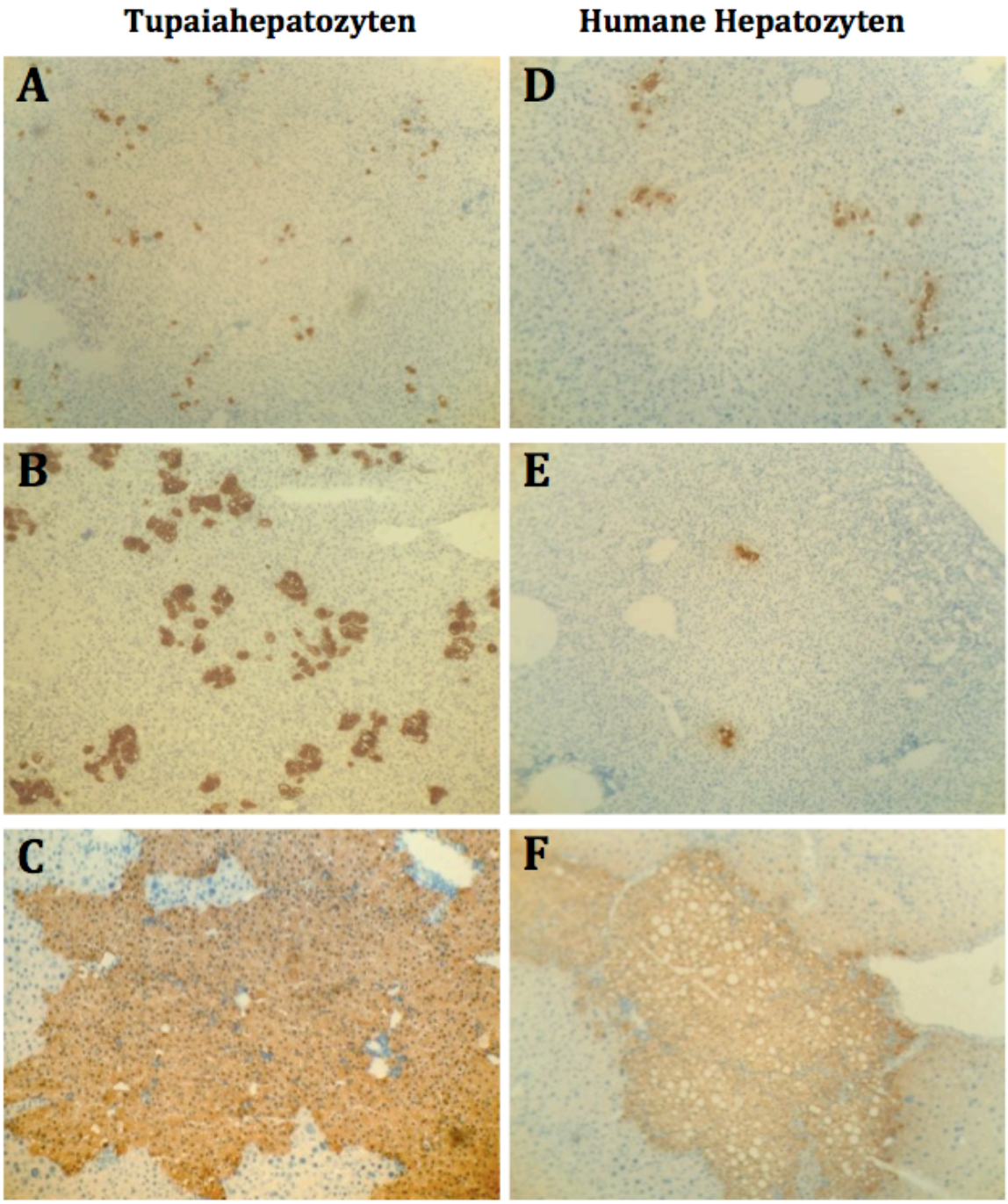


Abbildung 11: *Immunhistochemische Standardfärbung gegen CK 18 und Hämatoxylin.* ***A-C:*** *Z.n. Transplantation mit frisch isolierten Tupaiahepatozyten. Zeitpunkte: 2 Tage, 1 Woche, 7 Wochen. Vergrößerung 10 X.* ***D-F:*** *Z.n. Transplantation mit frisch isolierten humanen Hepatozyten. Zeitpunkte: 3 Stunden, 1 Woche, 2 Monate. Vergrößerung 10 X.*
A: *2 Tage nach Transplantation. Analog zum humanen Transplantationsversuch nach 3 Stunden (D) ist nur ein geringer Anteil der transplantierten Tupaiahepatozyten nachweisbar.* ***B:*** *1 Woche nach Transplantation. Die Tupaiahepatozyten haben sich in die Leberplatte integriert und Zellcluster gebildet. Im Vergleich zu den humanen Hepatozyten (E) sind deutlich mehr Zellen nachweisbar.* ***C:*** *7 Wochen nach Transplantation. Die Zellcluster der Tupaiahepatozyten haben sich deutlich vergrößert und sind miteinander zu einem großen Zellcluster konfluiert. Die Zellmasse ist bereits größer als die der humanen Zellen nach 2 Monaten (F). Es lassen sich im Gegensatz zu den humanen Hepatozyten (F) keine lipomatösen Zelleinschlüsse nachweisen.*

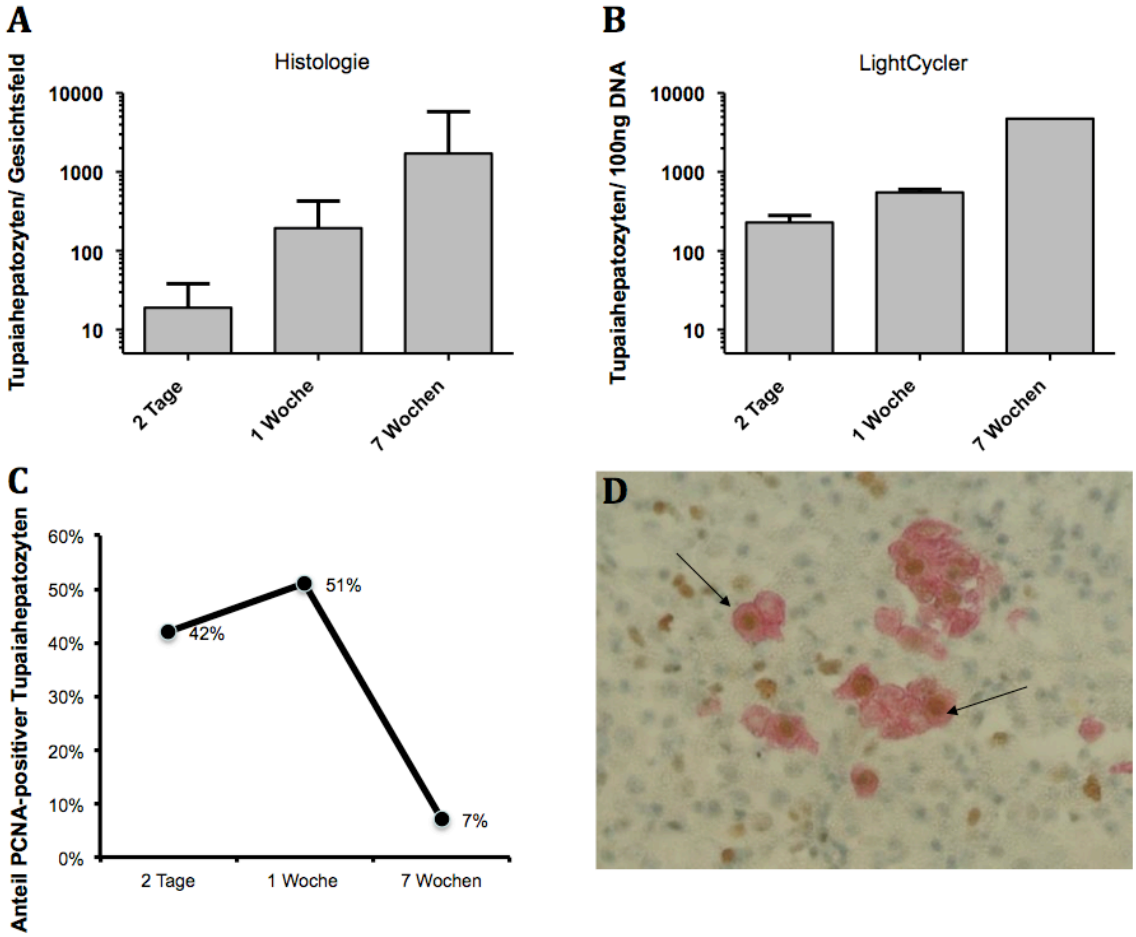


Abbildung 12: A und B: *Tupaiahepatozytenanzahl zu den einzelnen Zeitpunkten nach Transplantation, jeweils in der histologischen Analyse (A), sowie in der LightCycler Messung (B). Im Zeitverlauf kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Tupaiahepatozytenanzahl.* ***C:*** *Anteil PCNA-positiver Tupaiahepatozyten/ nachweisbarer Tupaiahepatozyten im Gesichtsfeld zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation.* ***D:*** *Immunhistochemische Standardfärbung PCNA (braun), CK 18 (rot) und Hämatoxylin (blau). Murines Lebergewebe 1 Woche post transplantationem mit Tupaiahepatozyten. Einige von ihnen sind PCNA-positiv (↑) und weisen somit proliferative Aktivität auf. Vergrößerung 40 X.*

Die Analyse der Integration der frisch transplantierten Human-/ Tupaiahepatozyten in das uPA-Maussystem zeigte somit folgende wesentliche Aspekte:

Trotz Messdifferenzen zwischen der Histologie und der LightCycler-Messung lassen beide Methoden einen gemeinsamen Trend erkennen. So ist nach Transplantation nur ein sehr geringer Anteil der ursprünglich transplantierten Hepatozyten nachweisbar. Innerhalb von 24 Stunden bzw. 2 Tagen post transplantationem kommt es zu einer deutlichen Reduktion der xenogen transplantierten Hepatozytenzahl. Die absolut erreichten Hepatozytenzahlen waren in der Tupaiagruppe deutlich größer. So konnten zum 1 Woche Zeitpunkt ca. 10 mal mehr Tupaia- als humane Hepatozyten detektiert werden (vgl. Abb. 9 B und 12 B). Die humanen Hepatozyten zeigten nach einem Monat lipomatöse Zelleinschlüsse, die bei den Tupaiahepatozyten nicht nachweisbar waren. Die humanen Hepatozyten als auch die Tupaiahepatozyten zeigten eine Woche nach Transplantation in der PCNA-Färbung proliferative Aktivität. Insgesamt ließen sich jedoch mehr Tupaiahepatozyten mit proliferativer Aktivität als humane Hepatozyten nachweisen.

Die LightCycler Messung quantifizierte in beiden Versuchsreihen (Tupaia und Human) grundsätzlich eine größerer Zellzahl als es sich aus der histologischen Analyse ergab.

4.5 Einfluss von Clodronat zur Steigerung der Repopulationseffizienz

Um die Repopulationseffizienz zu steigern wurde untersucht, inwiefern die Applikation von Clodronat zur Reduktion der mauseigenen monozytären Zellen den Überlebensvorteil von transplantierten humanen Hepatozyten erhöht. Der Versuch wurde in einen Vor- und Folgeversuch unterteilt.

Im Vorversuch wurde uPA-Mäusen aus der Versuchsgruppe eine Suspension mit 250µl mit einer Konzentration von 10µg/g Clodronat-Liposomen intraperitoneal appliziert. Dabei handelte es sich um nicht transplantierte Tiere. Nach 24 und 48 Stunden wurden sie sakrifiziert und anschließend hepatektomiert und dann mittels Immunfluoreszenzfärbung auf F 4/80 positive Zellen untersucht.

Im Folgeversuch wurden transplantierte uPA-Mäuse zu 4 verschiedenen Zeitpunkten eingesetzt. Einen Tag vor Transplantation mit humanen Hepatozyten wurden der Versuchsgruppe ebenfalls 250µl mit 10µg/g Clodronat-Liposomen intraperitoneal injiziert. Es wurden jeweils 3 Tiere 3 und 24 Stunden sowie 5 Tage nach Transplantation aus der Versuchsgruppe sakrifiziert, anschließend hepatektomiert und dann ebenfalls mittels Immunfluoreszenzfärbung auf F 4/80 positive Zellen untersucht. Äquivalent verhielt es sich mit den nicht transplantierten Tieren der Kontrollgruppe.
Bei 13 weiteren Tieren wurde 3 und 6 Wochen nach Transplantation Blut entnommen um es im Westernblot auf humanes Albumin hin zu untersuchen. Aus dieser Gruppe sind 3 Tiere im Versuchsverlauf aus unbekannten Gründen gestorben.

Im Vorversuch zeigte sich 24 Stunden nach Applikation von Clodronat-Liposomen in den nicht transplantierten Mäuse eine deutliche Reduktion von F 4/80 positiven Zellen. Nach 48 Stunden waren schließlich keine positiven Zellen mehr zu detektieren, während in der Kontrollgruppe ubiquitär F 4/80 positive Zellen nachweisbar blieben (Vgl. Abb 13 A-C).

Im Folgeversuch zeigte sich in der Fluoreszenzfärbung gegen CK 18 und F 4/80 bei den nicht mit Clodronat vorbehandelten transplantierten Mäusen, dass die F 4/80 positiven Zellen teilweise in unmittelbarem Kontakt mit den transplantierten humanen Hepatozyten stehen. In der Versuchsgruppe der vorbehandelten Tiere ließ sich diese Beobachtung nicht machen. Hier war keine Interaktion zwischen F 4/80 positiven und CK18 positiven Zellen

festzustellen. Nach 5 Tagen hatten sich die humanen Hepatozyten in die murine Leberplatte integriert und verhielten sich analog zu den Transplantationsversuchen aus Abschnitt 4.2 und 4.3.

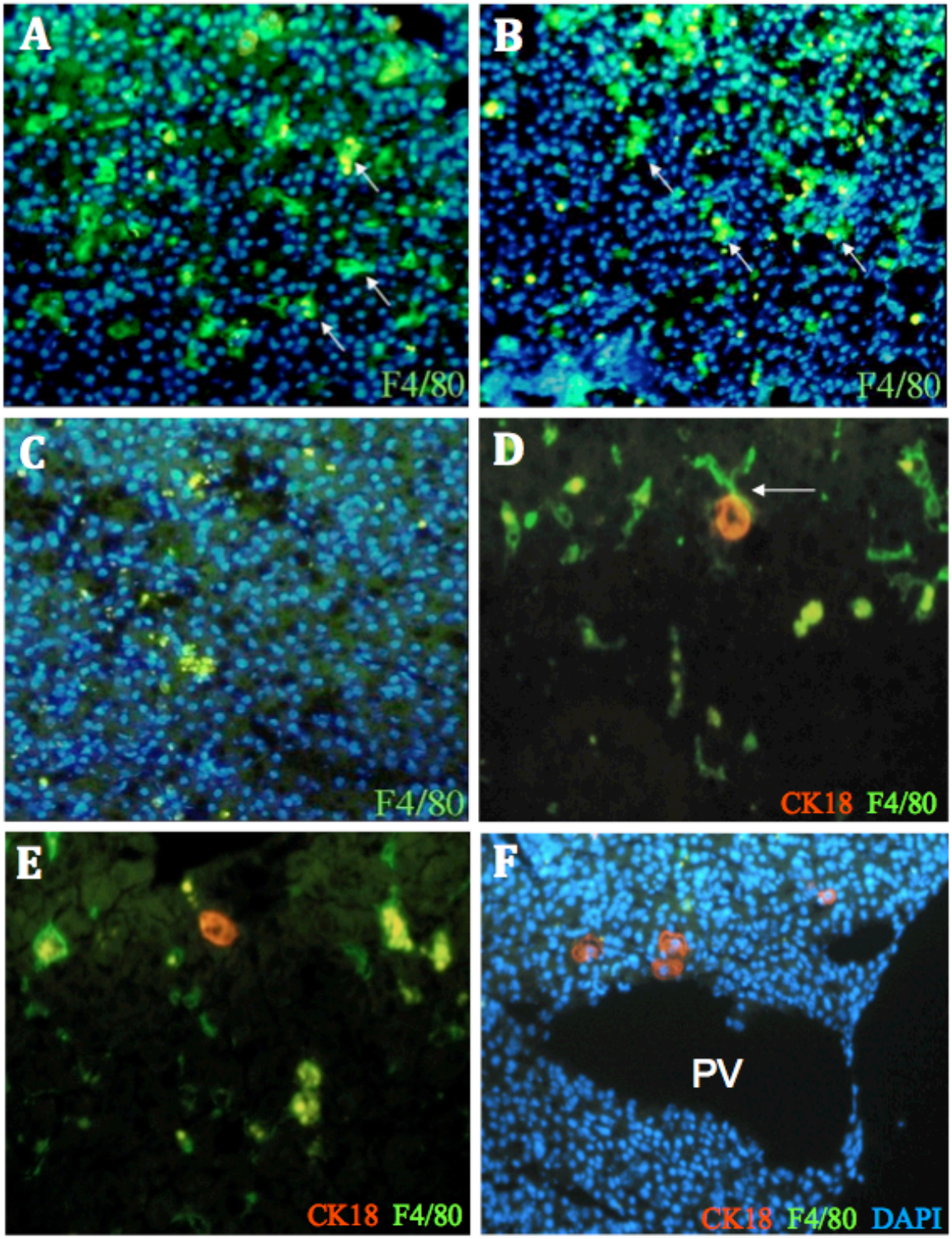


Abbildung 13: A-C: *Fluoreszenzdoppelfärbung gegen F 4/ 80 positive Zellen und DAPI Kernfärbung. Vergrößerung 10 X.* ***A:*** *Kontrolltier. Keine Vorbehandlung mit Clodronat-Loposomen. Es sind viele F 4/80 positive Zellen nachweisbar (↑).* ***B:*** *24 Stunden nach Clodronatapplikation.* ***C:*** *48 Stunden nach Clodronatapplikation. In den mit Clodronat vorbehandelten Tieren zeigte sich eine deutliche Reduktion der F 4/ 80 positiven Zellen im Vergleich zum 24 Stundenzeitpunkt. Es ließen sich kaum F 4/ 80 positive Zellen mehr nachweisen. Der floureszenzmarkierte Antikörper ging hier Bindungen mit Zelldetritus ein.* ***D u. E:***

Fluoreszenzdoppelfärbung gegen CK18 und F 4/ 80 positive Zellen. 24 Stunden nach Transplantation mit humanen Hepatozyten. Vergrößerung 40 X. ***D:*** *Ohne Clodronatvorbehandlung. F 4/80 positive Zellen zeigen einen unmittelbaren Kontakt mit einem humanen Hepatozyten (↑).* ***E:*** *Mit Clodronatvorbehandlung. Es sind kaum F 4/80 positive Zellen nachweisbar. Der fluoreszenzmarkierte Antikörper ging hier Bindungen mit Zelldetritus ein.* ***F:*** *Fluoreszenztripelfärbung gegen CK18, F 4/80 und DAPI. Vorbehandlung mit Clodronat-Liposomen, 5 Tage nach Transplantation. Die humanen Hepatozyten haben sich in die murine Leberplatte integriert. F 4/ 80 positive Zellen sind kaum nachweisbar. Vergrößerung 10 X. PV: Portalvene*

Bezüglich der Integration der transplantierten humanen Zellen innerhalb der ersten 3 und 24 Stunden war kein deutlicher Unterschied zwischen der mit Clodronat vorbehandelten Versuchsgruppe und der nicht vorbehandelten Kontrollgruppe festzustellen. In beiden Versuchsgruppen zeigte sich eine Integrationskinetik, die mit den bereits beschriebenen Versuchen aus den Abschnitten 4.2 und 4.3 vergleichbar war. So war es 24 Stunden nach Transplantation im Vergleich zum 3 Stundenzeitpunkt nach Transplantation ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der humanen Hepatozytenzahl gekommen. Erst zum späteren Zeitpunkt von 5 Tagen nach Transplantation war histologisch eine leicht erhöhte Anzahl CK18 positiver Zellen in den mit Clodronat vorbehandelten Tieren nachzuweisen. Es zeigte sich in der mikroskopischen Auszählung lediglich, dass die mit Clodronat vorbehandelten Mäuse ein insgesamt leicht erhöhtes Engraftment aufwiesen (vgl. Abb. 15).

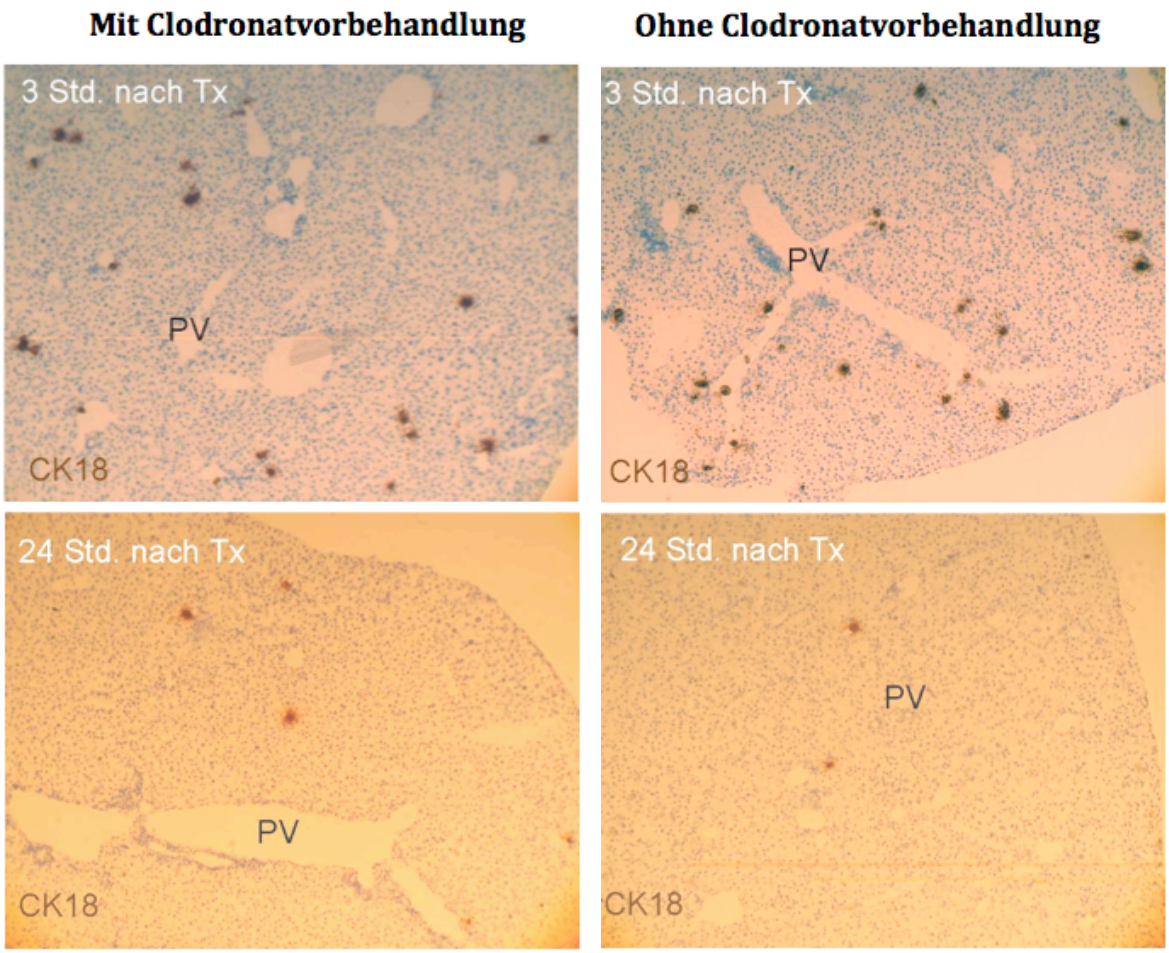
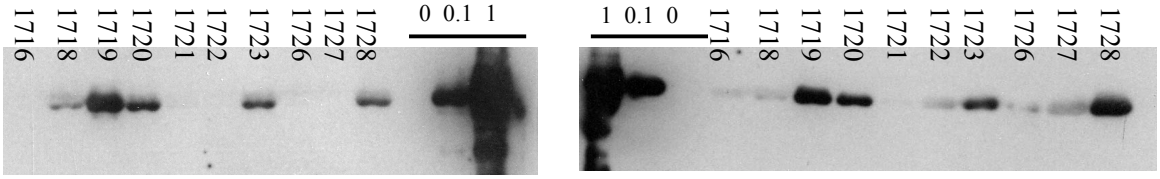


Abbildung 14: *Immunhistochemische Standardfärbung gegen CK18 und Hämatoxylin. Vergrößerung 10 X. Bezüglich der Integrationskinetik der humanen Hepatozyten war kein deutlicher Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne Vorbehandlung mit Clodronat festzustellen. Deutliche Reduktion der humanen Hepatozytenzahl nach 24 Std. in beiden Versuchsgruppen.*

	3 Std.		24 Std.		5 Tage	
Tiernummer:	Clo	Ø	Clo	Ø	Clo	Ø
#1	0	90	4,5	5,5	0	4,5
#2	120	200	1,5	3,5	18	10,5
#3	110	72	4	6	-	0

Abbildung 15: *Mikroskopische Auszählung eines Gesichtsfeldes. Anzahl der CK 18 positiven Zellen nach 3 und 24 Std., sowie nach 5 Tagen. Deutliche Reduktion der CK 18 positiven Zellen innerhalb von 24 Stunden. Nach 5 Tagen leichter Anstieg der humanen Zellzahl mit leicht erhöhter Rate in Tier 2 mit Clodronatvorbehandlung. Clo: mit Clodronat-Liposomen vorbehandelt. Ø: nicht mit Clodronat-Liposomen vorbehandelt (Kontrollgruppe). -: Tier frühzeitig gestorben.*

Bei 13 weiteren, mit Clodronat vorbehandelten, uPA-Mäusen wurde 3 und 6 Wochen nach Transplantation Blut abgenommen und im Westernblot auf humanes Albumin untersucht. In der nichttransplantierten Kontrollgruppe ließ sich kein humanes Albumin nachweisen. In der transplantierten Versuchsgruppe starben im Verlauf 3 Tiere aus unbekannten Gründen. In 4 der verbliebenen 10 Versuchstiere war humanes Albumin nachzuweisen. Nach 3 und 6 Wochen konnte bei diesen 4 uPA-Mäusen ein konstantes Bandensignal im Westernblot für humanes Albumin nachgewiesen werden. Nach 6 Wochen war im Vergleich zum 3 Wochen-Zeitpunkt eine leichte Zunahme der Signalstärke, zu beobachten (Vgl. Abb. 16).



3 Wochen post Tx **6 Wochen post Tx**

Abbildung 16: *Westernblot auf humanes Albumin 3 und 6 Wochen in uPA-Mäusen nach Transplantation mit humanen Hepatozyten. Vorbehandlung mit Clodronat-Liposomen.*

5 Diskussion

Das uPA-Mausmodell wird von wenigen Arbeitsgruppen untersucht und eingesetzt. Frühere Studien konnten zeigen, dass sich allogen als auch xenogen transplantierte Hepatozyten in das Mausleberparenchym integrieren, die Mauslebern zu einem Teil repopulieren und über einen längeren Zeitraum ihre Zellfunktionen aufrecht erhalten können (28). Die hochgradige Differenzierung der transplantierten humanen Hepatozyten wird besonders darin deutlich, dass sie permissiv für hepatotrope Viren sind (1, 30). Eine Beschränkung des Tiermodells ist es, dass die Repopulation der murinen Leber mit humanen Hepatozyten noch sehr variabel ist (39). Ziel der Arbeit war es daher besonders, die bislang noch nicht untersuchten initialen Schritte des Engraftments von primären humanen Hepatozyten im uPA-Maussystem und im Vergleich mit primären Tupaiahepatozyten zu charakterisieren. Weiterhin war der Frage nachzugehen, ob die humanen Hepatozyten eine vergleichbare proliferative Kapazität im uPA-Maussystem wie die Tupaiahepatozyten besitzen.

Um zusätzlich zur histologischen Auswertung einen weiteren unabhängigen Assay zur Beurteilung des Engraftments, der Integration und der Repopulation zur Verfügung zu haben, wurde hierfür zunächst ein real-time PCR Assay (LightCycler) etabliert (40). Dieser ermöglichte den quantitativen Nachweis von humanen Hepatozyten in der Mausleber. Er basiert auf dem selektiven Nachweis des humanen ß-Globin Gens. In der Arbeit konnte hierbei gezeigt werden, dass der Assay 10 bis 10.000 humane Hepatozyten quantifizieren kann ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.0995$ (Pearson-Korrelation)). Die Quantifizierung wurde nicht durch eine artifizielle Beimischung von muriner DNA negativ beeinflusst.

5.1 Kinetik des Engraftments von Human- und Tupajahepatozyten

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit lag in der Analyse der Kinetik des Engraftments und der Integration von intrasplenal transplantierten Human- und Tupaiahepatozyten in uPA-Mauslebern.

Daher wurden in dieser Arbeit 2 Transplantationsrunden, eine mit frisch isolierten humanen Hepatozyten, und eine mit frisch isolierten Tupaiahepatozyten, miteinander verglichen. Dabei zeigte sich in beiden Versuchen, dass nur ca. 10% der transplantierten Hepatozyten 3 Stunden nach intrasplenaler Injektion in der Leber mittels LightCycler-

Messung bzw. in der histologischen Analyse nachweisbar waren. Dies bestätigt experimentelle Daten aus der Ratte in der ebenfalls nur ein geringer Teil (< 30%) der transplantierten Hepatozyten 24 Stunden nach Transplantation nachgewiesen werden konnte (13).
Die transplantierten Hepatozyten ließen sich 3 Stunden nach Transplantation histologisch hauptsächlich in den Pfortaderästen und am Übergang zu den Sinusoiden der Mausleber nachweisen. Erst nach 1 Woche waren die Hepatozyten (Human und Tupaia) in das Leberparenchym der Maus integriert. Interessanterweise zeigte sich in dieser Phase ein deutlicher Unterschied zwischen den Human- und Tupaiahepatozyten. Bei den Tupaiahepatozyten erhöhte sich die Anzahl der Zellen signifikant, während die Anzahl der humanen Leberzellen absank. Bei letzteren kam es somit zu einem Zellverlust von 74% bzw. 29%.

Die Ursachen für dieses unterschiedliche Verhalten sind noch unklar, aber möglicherweise ist die „Fitness“ der Tupaia- und der Humanhepatozyten unterschiedlich. Während die humanen Hepatozyten aus tumorfreien Resektionsrändern von Patienten mit Lebermetastasen sowie Lebergewebe, die aufgrund von traumatischen Läsionen für Transplantationen abgelehnt wurden, gewonnen wurden, stammen die Tupaiahepatozyten aus einem jungen gesunden Tier. So haben Hepatozyten von älteren Spendern auch eine niedrigere Vitalitätsrate. Ebenfalls ist die Dauer der warmen Ischämiezeit von entscheidender Bedeutung für die Transplantation, das Engraftment und die Proliferation (41).
Außerdem scheint Tupaia belangeri der Maus phylogenetisch näher als dem Menschen zu sein, sodass sich die Tupaiahepatozyten ggf. effizienter in die murine Leber integrieren können.

Im weiteren Verlauf nahm sowohl die Human- als auch die Tupaiazellzahl in der Maus immer weiter zu. So stieg die Anzahl der humanen Hepatozyten nach 2 Monaten signifikant auf im Median 1722 humane Hepatozyten/ Gesichtsfeld. Die Anzahl der Tupaiahepatozyten stieg ebenfalls signifikant auf im Median 1698 Tupaiahepatozyten/ Gesichtsfeld. Rechnerisch bedeutet dies, dass jede der transplantierten Human- bzw. Tupaiahepatozyten, die sich in das Leberparenchym integriert hat, in diesem Zeitraum ca. 6-8 Zellteilungen durchlaufen hat.

Interessanterweise ließ sich mittels Immunhistochemie bereits früh eine deutliche Proliferation der Human- und Tupaiahepatozyten nachweisen. So waren 24 Stunden nach Transplantation 34 % der humanen Hepatozyten und 2 Tage nach Transplantation 42 % der Tupaiahepatozyten PCNA-positiv. Der Anteil der proliferierenden Hepatozyten blieb bei beiden Transplantationsrunden auch nach einer Woche auf hohem Niveau mit einem leichten Abfall auf 24 % PCNA-positive humane Hepatozyten, bzw. stieg bei den Tupaiahepatozyten noch weiter an und erreichte dort den Höhepunkt von ca. 51 % PCNA- positiven Tupaiahepatozyten.

Normalerweise beträgt der Zellumsatz in einer gesunden humanen Leber eines Erwachsenen lediglich weniger als 0,1 % (42). Ein vergleichbarer starker Stimulus ist sonst nach partieller Hepatektomie in Mausversuchen zu beobachten, bei der ca. 76 % der Hepatozyten in den ersten 1,5 Tagen proliferieren (19).

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten uPA-Mäuse waren heterozygot, sodass die uPA-negativen Maushepatozyten mit den xenogen transplantierten Hepatozyten kompetitiv mitwachsen. Bei Verwendung von homozygoten uPA-Mäusen ist daher ein länger andauernder selektiver Wachstumsvorteil der transplantierten Hepatozyten zu erwarten. Dies zeigt sich auch in aktuellen Arbeiten, in denen Arbeitsgruppen ausschließlich mit homozygoten Tieren arbeiten (43, 44, 56).

Zu beachten ist, dass trotz der beobachteten starken Proliferation die Zelldifferenzierung in den humanen Hepatozyten hoch geblieben ist (45, 46). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch den Nachweis von verschiedenen leberzellspezifischen Proteinen dargestellt werden. So konnte Lamin b, ein Integralprotein der inneren Kernmembran von humanen Zellen, der Transkriptionsfaktor HNF 4, und Cytochrom-P 450 nachgewiesen werden. Zudem ließen sich auch funktionierende Zellverbindungen zwischen den murinen und den humanen Hepatozyten darstellen. Es gelang der Nachweis von gap junctions (Connexin 32), sowie Gallencanaliculi, die von tight junctions und Desmosomen flankiert wurden. Dadurch wird die erfolgreiche funktionelle Integration der humanen Hepatozyten in die murine Leber deutlich.

Abschließend war untersucht worden, ob durch die Applikation von in Liposomen eingekapseltem Clodronat vor der Transplantation, zur Deletierung von murinen

Makrophagen (Kupfferzellen), das Engraftment der transplantierten humanen Hepatozyten gesteigert werden kann (24). Zwar konnten die F 4/80 positiven Zellen durch die Clodronatgabe reduziert werden, jedoch konnte kein messbarer Effekt auf das Engraftment nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit das große Wachstumspotential von Human- und Tupaiahepatozyten. Beide proliferieren nach xenogener Transplantation vergleichbar stark, durchlaufen daher mehrere Zellteilungen und können somit die Empfängerleber zum großen Teil repopulieren.
Es scheinen nur wenige der ursprünglich transplantierten humanen Hepatozyten zu überleben, während die verbliebenden jedoch deutlich proliferieren. Die transplantierten Tupaiahepatozyten überleben zum größeren Teil. Besonders entscheidend für die Repopulation scheinen die ersten 24 Stunden nach Transplantation zu sein. In diesem Zeitraum kommt es zum signifikanten Verlust der transplantierten Human- und Tupaiahepatozyten. Die verbliebenden Hepatozyten sind in der folgenden Zeit aufgrund ihrer enormen proliferativen Kapazität in der Lage einen großen Teil der Empfängerleber zu repopulieren. Interessant ist dabei besonders, dass die humanen Hepatozyten trotzdem ihre hohe funktionelle Differenzierung aufrechterhalten. Zukünftig sollte daher versucht werden, das initiale Engraftment zu verbessern, so dass mehr transplantierte Hepatozyten die ersten 24 Stunden überleben und damit höhere Repopulationsraten ermöglicht werden können.

Die Bedeutung des Engraftments für den Repopulationserfolg kann ggf. zukünftig dazu genutzt werden, die Repopulationsraten im uPA-Maussystem und ggf. auch die klinische Anwendung von Hepatozytentransplantationen im Patienten zu verbessern.

6 Zusammenfassung

Das uPA/ SCID-Mausmodell ist ein einzigartiges Leberrepopulationsmodell, beruhend auf einem für die endogenen Maushepatozyten toxischen Transgen. Die Ursachen für unterschiedliche Repopulationsraten von z.B. Tupaia- und primären Humanhepatozyten sind bislang nicht geklärt. Zur besseren Charakterisierung wurde in der vorliegenden Arbeit das Engraftment, die Integration und die Proliferation von Human- und Tupaiahepatozyten im uPA/ SCID-Mausmodell untersucht. In der Arbeit konnte mithilfe eines neu etablierten real-time PCR Assays (LightCycler Messung) gezeigt werden, dass fast 40 mal mehr Tupaiahepatozyten die Transplantation überleben und sich längerfristig in das murine Leberparenchym integrieren. Sowohl Human- als auch Tupaiahepatozyten integrierten sich nicht im Verband sondern als Einzelzellen. Interessanterweise zeigte sich bereits 1 Tag nach Transplantation ein großer Teil (ca. 30 - 40%) der überlebenden Hepatozyten (Human und Tupaia) als PCNA-positiv. Die starke Proliferation manifestierte sich auch histologisch in einem deutlichen Wachstum sog. Zellcluster von im Median 5 Hepatozyten/ Cluster zum Zeitpunkt von 1 Woche nach Transplantation auf 244 Hepatozyten/ Cluster zum Zeitpunkt von 2 Monaten nach Transplantation. Da die meisten Zellcluster monoklonalen Ursprungs sind, teilten sich rechnerisch sowohl die Tupaia- als auch die Humanhepatozyten über den Beobachtungszeitraum von 1 - 2 Monaten durchschnittlich 6 - 8 mal. Interessanterweise waren die humanen Leberzellen trotz der starken Proliferation hoch differenziert, was durch eine positive immunhistologische Färbung auf Albumin, HNF4 und Cytochrom P450, durch neu gebildete Gallencanaliculi, und tight- und gap junctions zwischen humanen sowie humanen und murinen Leberzellen gezeigt werden konnte. Im Vergleich der beiden Spezies konnte in der Arbeit eindeutig nachgewiesen werden, dass das initiale Engraftment innerhalb der ersten 24 Stunden nach Transplantation, und nicht ein reduziertes Wachstum der humanen Hepatozyten, der entscheidende Faktor für den Repopulationserfolg der uPA/ SCID-Mäuse ist. Leider konnte durch eine Vorbehandlung der uPA/ SCID-Mäuse mit Clodronat das initiale Engraftment der humanen Leberzellen nicht signifikant gesteigert werden. In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die primären humanen Leberzellen in vivo unter Erhalt der Zelldifferenzierung eine erstaunliche proliferative Aktivität besitzen. Die Bedeutung des Engraftments für den Repopulationserfolg kann ggf. zukünftig dazu genutzt werden die Repopulationsraten im uPA-Maussystem und ggf. auch die klinische Anwendung von Hepatozytentransplantationen im Patienten zu verbessern.

7 Literaturverzeichnis

1. Petersen J, Dandri M, Gupta S, et al. 1998 Liver repopulation with xenogenic hepatocytes in B and T cell-deficient mice leads to chronic hepadnavirus infection and clonal growth of hepatocellular carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 95:310-5.
2. Dandri M, Burda MR, Zuckerman DM, et al. 2005 Chronic infection with hepatitis B viruses and antiviral drug evaluation in uPA mice after liver repopulation with tupaia hepatocytes. J Hepatol 42:54-60.
3. Dandri M, Burda MR, Torok E, et al. 2001 Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. Hepatology 33:981-8.
4. Busuttil RW, Farmer DG. 1996 The surgical treatment of primary hepatobiliary malignancy. Liver Transpl Surg 2:114-30.
5. Lake JR. 1998 Hepatocyte transplantation. N Engl J Med 338:1463-5.
6. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. 1994 Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. Nat Genet 6:335-41.
7. Nussler A, Konig S, Ott M, et al. 2006 Present status and perspectives of cell-based therapies for liver diseases. J Hepatol 45:144-59.
8. Allen KJ, Soriano HE. 2001 Liver cell transplantation: the road to clinical application. J Lab Clin Med 138:298-312.
9. Sgroi A, Serre-Beinier V, Morel P, et al. 2009 What clinical alternatives to whole liver transplantation? Current status of artificial devices and hepatocyte transplantation. Transplantation 87:457-66.
10. Sato Y, Yamada H, Iwasaki K, et al. 2008 Human hepatocytes can repopulate mouse liver: histopathology of the liver in human hepatocyte-transplanted chimeric mice and toxicologic responses to acetaminophen. Toxicol Pathol 36:581-91.
11. Matas AJ, Sutherland DE, Steffes MW, et al. 1976 Hepatocellular transplantation for metabolic deficiencies: decrease of plasms bilirubin in Gunn rats. Science 192:892-4.
12. Groth CG, Arborgh B, Bjorken C, et al. 1977 Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. Transplant Proc 9:313-6.
13. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, et al. 1999 Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. Hepatology 29:509-19.
14. Rajvanshi P, Kerr A, Bhargava KK, et al. 1996 Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. Gastroenterology 111:1092-1102.
15. Ponder KP, Gupta S, Leland F, et al. 1991 Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. Proc Natl Acad Sci U S A 88:1217-21.
16. Zhang H, Miescher-Clemens E, Drugas G, et al. 1992 Intrahepatic hepatocyte transplantation following subtotal hepatectomy in the recipient: a possible model in the treatment of hepatic enzyme deficiency. J Pediatr Surg 27:312-5; discussion 315-6.

17. Kokudo N, Ohashi K, Takahashi S, et al. 1994 Effect of 70% hepatectomy on DNA synthesis in rat hepatocyte isograft into the spleen. Transplant Proc 26:3464-5.
18. Rabes HM, Wirsching R, Tuczek HV, et al. 1976 Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatecomy. Cell Tissue Kinet 9:517-32.
19. Grisham JW. 1962 A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. Cancer Res 22:842-9.
20. Bucher NL, Swaffield MN. 1964 The Rate of Incorporation of Labeled Thymidine into the Deoxyribonucleic Acid of Regenerating Rat Liver in Relation to the Amount of Liver Excised. Cancer Res 24:1611-25.
21. Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, et al. 1998 Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. Am J Pathol 153:319-29.
22. Laconi S, Pillai S, Porcu PP, et al. 2001 Massive liver replacement by transplanted hepatocytes in the absence of exogenous growth stimuli in rats treated with retrorsine. Am J Pathol 158:771-7.
23. Lieber A, Peeters MJ, Gown A, et al. 1995 A modified urokinase plasminogen activator induces liver regeneration without bleeding. Hum Gene Ther 6:1029-37.
24. van Rooijen N, van Nieuwmegen R. 1984 Elimination of phagocytic cells in the spleen after intravenous injection of liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. An enzyme-histochemical study. Cell Tissue Res 238:355-8.
25. Heckel JL, Sandgren EP, Degen JL, et al. 1990 Neonatal bleeding in transgenic mice expressing urokinase-type plasminogen activator. Cell 62:447-56.
26. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, et al. 1991 Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. Cell 66:245-56.
27. Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, et al. 1994 Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. Science 263:1149-52.
28. Rhim JA, Sandgren EP, Palmiter RD, et al. 1995 Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 92:4942-6.
29. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, et al. 1992 RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. Cell 68:855-67.
30. Mercer DF, Schiller DE, Elliott JF, et al. 2001 Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. Nat Med 7:927-33.
31. Fausto N. 2001 A mouse model for hepatitis C virus infection? Nat Med 7:890-1.
32. Walter E, Keist R, Niederost B, et al. 1996 Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. Hepatology 24:1-5.
33. Kock J, Baumert TF, Delaney WEt, et al. 2003 Inhibitory effect of adefovir and lamivudine on the initiation of hepatitis B virus infection in primary tupaia hepatocytes. Hepatology 38:1410-8.
34. Novacek MJ. 1992 Mammalian phylogeny: shaking the tree. Nature 356:121-5.
35. Guitart A, Riezu-Boj JI, Elizalde E, et al. 2005 Hepatitis C virus infection of primary tupaia hepatocytes leads to selection of quasispecies variants, induction of interferon-stimulated genes and NF-kappaB nuclear translocation. J Gen Virol 86:3065-74.
36. Dandri M, Burda MR, Gocht A, et al. 2001 Woodchuck hepatocytes remain permissive for hepadnavirus infection and mouse liver repopulation after cryopreservation. Hepatology 34:824-33.

37. Petersen J, Dandri M, Mier W, et al. 2008 Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein. Nat Biotechnol 26:335-41.
38. Dandri M, Murray JM, Lutgehetmann M, et al. 2008 Virion half-life in chronic hepatitis B infection is strongly correlated with levels of viremia. Hepatology 48:1079-86.
39. Vanwolleghem T, Libbrecht L, Hansen BE, et al. Factors determining successful engraftment of hepatocytes and susceptibility to hepatitis B and C virus infection in uPA-SCID mice. J Hepatol 53:468-76.
40. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, et al. 1997 The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. Biotechniques 22:176-81.
41. Kawahara T, Toso C, Douglas DN, et al. Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. Liver Transpl 16:974-82.
42. Fausto N, Campbell JS. 2003 The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. Mech Dev 120:117-30.
43. Meuleman P, Libbrecht L, De Vos R, et al. 2005 Morphological and biochemical characterization of a human liver in a uPA-SCID mouse chimera. Hepatology 41:847-56.
44. Tateno C, Kataoka M, Utoh R, et al. Growth hormone-dependent pathogenesis of human hepatic steatosis in a novel mouse model bearing a human hepatocyte-repopulated liver. Endocrinology 152:1479-91.
45. Tateno C, Yoshizato K. 1996 Growth and differentiation in culture of clonogenic hepatocytes that express both phenotypes of hepatocytes and biliary epithelial cells. Am J Pathol 149:1593-605.
46. Yamasaki C, Tateno C, Aratani A, et al. 2006 Growth and differentiation of colony-forming human hepatocytes in vitro. J Hepatol 44:749-57.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich in erster Linie bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. rer. nat. Maura Dandri und ihrem Mann Herrn Prof. Dr. med. Jörg Petersen für die Überlassung des Themas und Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes bedanken.

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Marc Lütgehetmann und Herrn Dr. Tassilo Volz für die wissenschaftliche und fachliche Betreuung sowie für die Einführung in die Arbeitsmethoden. Sie standen mir stets kritisch und konstruktiv bei der Durchführung der Methoden sowie der Auswertung der Ergebnisse bei.

Der Schlussdank soll besonders herzlich an meine Eltern Inge und Hans König gehen. Sie haben mir nicht nur mein Studium ermöglicht, sondern haben auch durch ihre Geduld und ihre moralische Unterstützung mich auf meinem Weg durch diese Arbeit begleitet.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Unterschrift: .....