

# **Mechanismen der Leberrepopulation in einem Mausmodell zur Hepatozytentransplantation - eine besondere Rolle von c-Met und NEMO**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der RWTH Aachen  
University zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften  
genehmigte Dissertation  
vorgelegt von

Diplom-Biologin

**Michaela Kaldenbach**

aus Aachen

Berichter:

Universitätsprofessor Dr. rer nat Hermann Wagner

Privatdozent Dr. med Konrad Streetz

Tag der mündlichen Prüfung:

28.06.2012

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.





# 1. Inhaltsverzeichnis

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INHALTSVERZEICHNIS</b>                                                             | <b>1</b>  |
| <b>2. ZUSAMMENFASSUNG</b>                                                                | <b>4</b>  |
| <b>3. EINLEITUNG</b>                                                                     | <b>5</b>  |
| 3.1. Anatomie und Physiologie der Leber                                                  | 6         |
| 3.2. Leberregeneration                                                                   | 8         |
| 3.2.1. Zellzyklus                                                                        | 8         |
| 3.2.2. Leberregenerationsmodell: Partielle Hepatektomie                                  | 9         |
| 3.2.3. Leberregenerationsmodell: Hepatozytentransplantation                              | 10        |
| 3.2.4. Induktion einer Leberschädigung im Rahmen von Regenerationsanalysen               | 12        |
| 3.2.5. Mechanismen der Leberzellproliferation nach Transplantation in Selektionsmodellen | 14        |
| 3.3. HGF/c-met Signalweg und das “invasive growth program”                               | 15        |
| 3.3.1. Die Rolle des HGF/c-Met Signalweges bei der Leberregeneration                     | 17        |
| 3.3.2. HGF-Antagonist NK4                                                                | 18        |
| 3.4. Die Bedeutung von NFkB in der Leber                                                 | 19        |
| 3.5. Technik der konditionalen knockout-Maus                                             | 21        |
| 3.5.1. Die konditionale c-Met <i>knockout</i> Maus                                       | 21        |
| 3.5.2. Die konditionale NEMO <i>knockout</i> Maus                                        | 23        |
| 3.6. Ziel dieser Studie                                                                  | 24        |
| <b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>                                                          | <b>25</b> |
| 4.1. Instrumente                                                                         | 25        |
| 4.2. Verbrauchsmaterialien                                                               | 26        |
| 4.2.1. Verbrauchsmaterialien                                                             | 26        |
| 4.2.2. Erst-Antikörper                                                                   | 26        |
| 4.2.3. Zweit-Antikörper                                                                  | 27        |
| 4.2.4. Chemikalien, Puffer und Enzyme                                                    | 27        |
| 4.3. Kits                                                                                | 30        |
| 4.4. Experimentelle Tierarbeiten                                                         | 30        |
| 4.4.1. Verwendete Mausstämme                                                             | 30        |
| 4.4.2. Blutentnahme                                                                      | 31        |
| 4.4.3. Induktion einer Leberschädigung durch Bestrahlung                                 | 31        |
| 4.4.4. Isolation von Knochenmark                                                         | 32        |

|              |                                                                                                    |           |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.5.       | Knochenmarkstransplantation                                                                        | 32        |
| 4.4.6.       | Partielle Hepatektomie                                                                             | 32        |
| 4.4.7.       | Isolation primärer Hepatozyten                                                                     | 33        |
| 4.4.8.       | Hepatozytentransplantation                                                                         | 34        |
| 4.4.9.       | Organentnahme                                                                                      | 35        |
| <b>4.5.</b>  | <b>Genotypisierung der Versuchstiere</b>                                                           | <b>35</b> |
| 4.5.1.       | DNA Isolation aus Schwanzbiopsien                                                                  | 35        |
| 4.5.2.       | PCR–Polymerase chain reaction                                                                      | 36        |
| <b>4.6.</b>  | <b>RNA Methoden</b>                                                                                | <b>39</b> |
| 4.6.1.       | RNA Isolation aus Lebergewebe                                                                      | 39        |
| 4.6.2.       | Reverse Transkription                                                                              | 39        |
| 4.6.3.       | Quantitative PCR (Real-time PCR)                                                                   | 40        |
| <b>4.7.</b>  | <b>Immunhistochemie</b>                                                                            | <b>42</b> |
| 4.7.1.       | H&E Färbung                                                                                        | 42        |
| 4.7.2.       | Kollagenfärbung mit Sirius Rot                                                                     | 42        |
| <b>4.8.</b>  | <b>Immunfluoreszenzfärbung</b>                                                                     | <b>43</b> |
| 4.8.1.       | Humanes alpha 1-Antitrypsin (hAAT) Färbung                                                         | 43        |
| 4.8.2.       | BrdU-hAAT Doppelfärbung                                                                            | 44        |
| 4.8.3.       | Ki-67- $\beta$ -Catenin Doppelfärbung                                                              | 45        |
| 4.8.4.       | TUNEL Färbung                                                                                      | 45        |
| 4.8.5.       | CD4 Färbung                                                                                        | 46        |
| 4.8.6.       | CD11b Färbung                                                                                      | 46        |
| 4.8.7.       | F4/80 – hAAT Doppelfärbung                                                                         | 47        |
| 4.8.8.       | Collagen – hAAT Doppelfärbung                                                                      | 47        |
| 4.8.9.       | $\alpha$ -SMA – Färbung                                                                            | 48        |
| <b>4.9.</b>  | <b>ELISA-Serum Enzyme-linked Immunosorbend Assay</b>                                               | <b>49</b> |
| <b>4.10.</b> | <b>Proteinbiochemische Methoden</b>                                                                | <b>50</b> |
| 4.10.1.      | Proteinisolierung aus Lebergewebe                                                                  | 50        |
| 4.10.2.      | Bradford assay                                                                                     | 50        |
| 4.10.3.      | Western Blot                                                                                       | 51        |
| <b>4.11.</b> | <b>Zellkulturarbeiten</b>                                                                          | <b>52</b> |
| 4.11.1.      | Allgemeine Zellkulturarbeiten                                                                      | 52        |
| 4.11.2.      | S2 Zellkulturarbeiten mit Adenoviren                                                               | 52        |
| <b>4.12.</b> | <b>Analysen</b>                                                                                    | <b>54</b> |
| 4.12.1.      | Auswertungen von Immunfluoreszenzgefärbten Kryoschnitten                                           | 54        |
| 4.12.2.      | Statistische Analysen                                                                              | 54        |
| <b>5.</b>    | <b>ERGEBNISSE</b>                                                                                  | <b>55</b> |
| <b>5.1.</b>  | <b>Transplantation und Integration adulter Hepatozyten in der Leber</b>                            | <b>55</b> |
| <b>5.2.</b>  | <b>Analyse der Rolle von c-Met bei der Ansiedlung und Proliferation transplanteder Hepatozyten</b> | <b>58</b> |
| 5.2.1.       | c-Met in Donorhepatozyten ist essentiell für eine erfolgreiche Repopulation                        | 58        |
| 5.2.2.       | c-Met-Defizienz in Empfängertieren begünstigt positive Selektion von WT-Spenderzellen              | 59        |

|             |                                                                                                     |            |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.3.      | Die Deletion des c-Met Rezeptors ist ausreichend für eine positive Selektion der Spenderhepatozyten | 61         |
| 5.2.4.      | Proliferationsanalysen in transplantierten Lebern                                                   | 64         |
| 5.2.5.      | Analyse der apoptotischen Aktivität nach Hepatozyten-Transplantation                                | 68         |
| <b>5.3.</b> | <b>Schädigung und Regeneration des Gewebes vor und nach Hepatozytentransplantation</b>              | <b>70</b>  |
| 5.3.1.      | Histologische Analysen                                                                              | 70         |
| 5.3.2.      | Darstellung von Leber-Umbauzeichen nach Hepatozytentransplantation                                  | 72         |
| <b>5.4.</b> | <b>Aktivierung von HGF/c-Met induzierten intrazellulären Signalwegen</b>                            | <b>75</b>  |
| <b>5.5.</b> | <b>Rolle des Immunsystems im Rahmen der Hepatozytentransplantation</b>                              | <b>77</b>  |
| <b>5.6.</b> | <b>Inhibierung des c-Met Signalwegs durch den HGF-Antagonisten NK4</b>                              | <b>81</b>  |
| <b>5.7.</b> | <b>Effektive Inhibierung c-Met/HGF abhängiger Signalwege</b>                                        | <b>83</b>  |
| <b>5.8.</b> | <b>Selektion von Spenderhepatozyten nach HT in NEMO knockout-Mäusen</b>                             | <b>85</b>  |
| <b>6.</b>   | <b>DISKUSSION</b>                                                                                   | <b>94</b>  |
| 6.1.        | c-Met abhängige Repopulation nach Hepatozytentransplantation                                        | 94         |
| 6.2.        | Inhibierung des c-Met Rezeptors führt zu positiver Zellselektion                                    | 101        |
| 6.3.        | Repopulation nach HT in NEMO Mäusen                                                                 | 103        |
| <b>7.</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b>                                                                         | <b>106</b> |
| <b>8.</b>   | <b>PUBLIKATIONEN</b>                                                                                | <b>117</b> |
| <b>9.</b>   | <b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>                                                                        | <b>119</b> |
| <b>10.</b>  | <b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</b>                                                                    | <b>122</b> |
| <b>11.</b>  | <b>DANKSAGUNG</b>                                                                                   | <b>124</b> |
| <b>12.</b>  | <b>LEBENS LAUF</b>                                                                                  | <b>126</b> |

## 2. Zusammenfassung

Die Therapie des akuten und chronischen Leberversagens ist kausal oft nur durch eine Organtransplantation möglich. Eine vielversprechende Alternative stellt die Transplantation isolierter adulter Hepatozyten dar. Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss des HGF (hepatocyte growth factor)-Rezeptors c-Met auf Mechanismen der *in vivo* Repopulation in der Mausleber mittels konditionaler c-Met Knockout-Mäuse näher analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die HGF/c-Met abhängige Signalübermittlung sowohl in Spender- als auch in Empfängerzellen eine fundamentale Bedeutung für die Zellselektion besitzt. Die Verwendung c-Met defizienter Spenderzellen führte zu einer kompletten Aufhebung der Repopulationsfähigkeit, während die c-Met Deletion in Empfängerlebern zu einer anhaltenden Selektion von Wildtyp Spenderhepatozyten führte. Abhängig von der zusätzlich durchgeführten Empfängerkonditionierung konnte 12 Wochen nach Hepatozytentransplantation (HT) eine mehr als 50%ige Repopulation durch Spenderzellen erreicht werden. Ursächlich zeigte sich hier eine verschobene Balance zwischen Proliferation und Apoptose. c-Met defiziente Mäuse wiesen in Folge eine vermehrte Matrixansammlung (Collagen1 $\alpha$ ) auf. Molekularbiologische Analysen ergaben, dass AKT und STAT3 in dieser Gruppe signifikant geringer phosphoryliert wurden.

Im nächsten Schritt der Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einem experimentell therapeutischen Ansatz durch Gabe des HGF-Antagonisten (NK4) ebenfalls die *in vivo* Repopulation transplanterter Hepatozyten induziert werden konnte.

Final wurde das etablierte Hepatozytentransplantationssystem auf ein Mausmodell der endogenen fibrotischen Leberschädigung übertragen. Präkonditionierte konditionale NEMO-/- Mäuse konnten bei Verwendung Apoptose-resistenter Spenderzellen ebenfalls erfolgreich repopuliert werden.

Damit konnte das HGF/c-Met System als sehr bedeutsam für die erfolgreiche Durchführung der Hepatozytentransplantation herausgearbeitet werden. Es bietet zudem – durch Hemmung der c-Met Signaltransduktion in Empfängerzellen - einen attraktiven Ansatzpunkt für zukünftige therapeutische Interventionen.

### 3. Einleitung

Das Thema Organtransplantation ist im Moment aktueller als je zuvor. Laut Eurotransplant halten 82% der Deutschen Organspende für sinnvoll, doch nur 12% tragen selber einen Organspendeausweis mit sich. Im Jahre 2009 warteten 1800 Patienten in Deutschland auf eine Spenderleber, doch nur 1100 Spenderlebern von Organspendern standen zur Verfügung. Diese Diskrepanz zeigt, wie dringend notwendig es ist, einerseits Aufklärung im Bereich der Organspende zu betreiben, um die Zahl an Organspendern zu erhöhen. Andererseits zeigt dies, wie wichtig es ist alternative Therapiemethoden zu entwickeln, um die Transplantation ganzer Organe umgehen zu können.

Die Hintergründe, die einer Lebertransplantation zugrunde liegen sind vielfältig. Neben Alkohol- und Drogenmissbrauch gibt es eine Reihe von angeborenen Erkrankungen, bzw. metabolischen Störungen, die eine irreversible Schädigung der Leber nach sich ziehen. Auch Infektionen mit dem Hepatitis B Virus (HBV) bzw. dem Hepatitis C Virus (HCV) führen in vielen Fällen zu Leberzirrhose und sind in 30 % der Fälle Grundlage für die Entstehung von Leberzellkarzinomen (Perz et al. 2006).

Die Leberzelltransplantation stellt eine vielversprechende alternative Therapieoption zur Organtransplantation dar. Bei dieser Methode werden Leberzellen aus einem Spenderorgan isoliert um anschließend Patienten mit einer nicht medikamentös zu behandelnden Leberschädigung zu transplantieren. Das endogene Regenerationspotential der zu transplantierenden Leberzellen wird in diesem Fall für die Repopulation der geschädigten Leber ausgenutzt. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer deutlich geringeren benötigten Anzahl an Spenderorganen, da die isolierten Zellen einer Spenderleber auf mehrere Patienten verteilt werden können. Ein dem noch im Wege stehendes Problem ist die nicht ausreichende Repopulation der Spenderzellen in der Empfängerleber. Zur Vermeidung von thromboembolischen Komplikationen kann nur eine bestimmte Anzahl an Zellen auf einmal transplantiert werden. Weiterhin muss gewährleistet sein, dass diese Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber residenten Hepatozyten haben, um die geschädigte Leber repopulieren zu können.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich damit zu untersuchen, wie man diesen Selektionsvorteil erreichen kann. Dabei wird im Tiermodell der Hepatozytentransplantation der HGF/c-Met Signalweg besonders im Fokus der Untersuchungen stehen, da dieser in

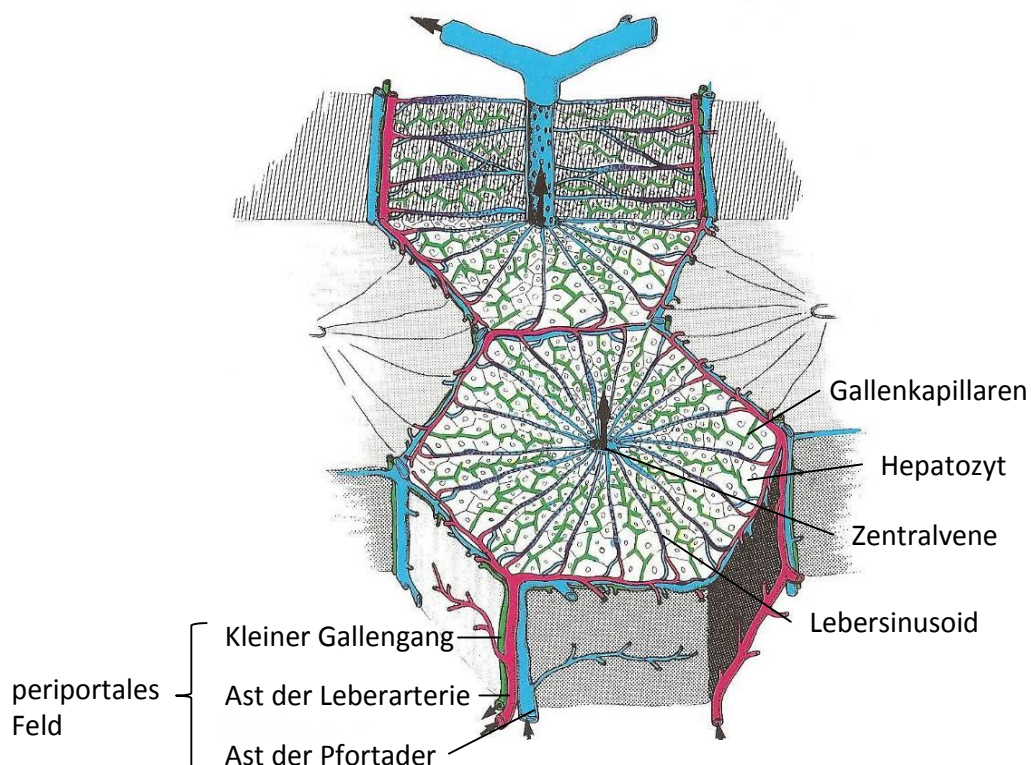


engem Zusammenhang mit der Leberregeneration zu sehen ist. Dies soll Aufschluss über die Repopulation nach Leberzelltransplantation geben und die Grundlage für die Etablierung weiterer Therapiemöglichkeiten sein.

### **3.1. Anatomie und Physiologie der Leber**

Die Leber spielt als größte organische Drüse des menschlichen Körpers eine zentrale Rolle im Metabolismus. Ihre Hauptaufgaben sind die Speicherung und Umverteilung von Nährstoffen, Fetten und Vitaminen, Synthese von Plasmaproteinen und Enzymen, sowie die Bildung der Gallensäuren. Weiterhin ist die Leber verantwortlich für die Detoxifikation von Medikamenten, Toxinen und Alkohol. Die Leber hat sich im Laufe der Evolution zu einem Organ entwickelt, das durch Regeneration und Abwehrmechanismen hervorragend toxische Schädigungen und Zellverlusten kompensiert. Aus diesem Grund ist der Aufbau der Leber, bestehend aus einer Vielzahl verschiedener Zelltypen, sehr komplex. Die Leberstruktur ist als Läppchenstruktur organisiert. Die menschliche Leber lässt sich in zwei große Leberlappen unterteilen. Diese wiederum bestehen in ihrer Ultrastruktur aus 1-2 mm großen Leberläppchen (Abb.2.1). Im Zentrum jedes Leberläppchens verläuft eine zentrale Vene. Die parenchymalen Zellen, die Hepatozyten, machen 80% der Leberzellen aus und sind entlang von Sinusoiden um die Zentralvene herum angeordnet. In den Sinusoiden werden das sauerstoffreiche Blut aus den Leberarterien und das nährstoffreiche Blut aus der Pfortader transportiert. An den Eckpunkten benachbarter Leberläppchen befinden sich die Periportalfelder die aus einem Zweig der hepatischen Pfortader, der *arteria hepatica* und einem Gallengang bestehen. Auf der Seite zum Lebersinusoid hin weisen sie einen Mikrovillisaum auf. Zwischen den Hepatozyten befinden sich kleine Gallengangskanälchen (*bile caniculi*), welche im Periportalfeld in die Gallengänge münden. 80 % der Leberzellen sind Hepatozyten, welche mit einem Durchmesser von 70 µm relativ groß sind. Hepatozyten entwickeln sich aus einem Hepatoblasten, einer endodermalen Vorläuferzelle. 25 % der Hepatozyten besitzen mehrere Zellekerne, wobei der Zellkern 5-10% der Zellmasse ausmacht. Die restlichen 20% der Leber bestehen aus nicht-parenchymalen Zellen, wie den Sternzellen, Kupffer-Zellen und Endothelzellen. Die Sternzellen (auch Stellat-, oder Ito-Zellen genannt) liegen in der Regel in einem inaktiven Zustand im sinusoidalen Raum vor. Ihre Funktion ist die Speicherung von Vitamin A. Sie werden durch Leberschädigung aktiviert und

leiten die Synthese von extrazellulärer Matrix und Kollagen ein. Kupffer-Zellen befinden sich ebenfalls im sinusoidalen Raum und stellen residente Makrophagen dar, die im Falle einer Leberschädigung zu dieser migrieren können und die Freisetzung von Zytokinen veranlassen. Endothelzellen begrenzen den sinusoidalen Raum zu einem Gefäß. Ihre Hauptaufgabe ist es, Nährstoffe aufzunehmen. Zusätzlich befindet sich eine gewisse Anzahl an Ovalzellen in der Leber, die eine Funktion als Vorläuferzellen für Hepatozyten wahrnehmen (Taub et al. 2004).



### Abbildung 2.1: Feinbau eines Leberläppchens.

Die Zentralvene bildet den Mittelpunkt eines Leberläppchens. Zwischen den sich darum anordnenden Hepatozyten verlaufen die Sinusoide. An den Grenzstellen zu benachbarten Leberläppchen findet man die Periportalfelder, welche aus einem kleinen Gallengang, einem Ast der Leberarterie und einem Ast der Pfortader bestehen. Insgesamt hat ein Leberläppchen des Menschen eine Größe von 1-2 mm (Abbildung modifiziert nach: Mörike: Biologie des Menschen).

### **3.2. Leberregeneration**

Eine Schädigung der Leber stimuliert die Hepatozyten zu proliferieren, um somit den Verlust funktionsfähiger Leberzellen zu kompensieren. Das kompensatorische Leberwachstum beruht dabei sowohl auf Hypertrophie (Zellgröße nimmt zu) als auch auf Hyperplasie (Zellzahl nimmt zu). Das Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren und Zytokinen zwischen den Leberzellen spielt bei diesem Vorgang eine entscheidende Rolle. Obwohl die Leber eine Reihe von LeberVorläuferzellen und Stammzellen aufweisen kann, wird die Regeneration in der Regel von adulten Hepatozyten bewerkstelligt. Sind die Hepatozyten in ihrer Proliferation jedoch durch z.B. toxische Substanzen geschädigt, differenzieren sich Ovalzellen und weitere Vorläuferzellen in Hepatozyten (Wang et al. 2003). Im normalen Zustand befinden sich die Hepatozyten in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus. Lediglich 0,0012% - 0,01% treten spontan und ohne Stimulus in die Mitose ein (Koniaris et al. 2003).

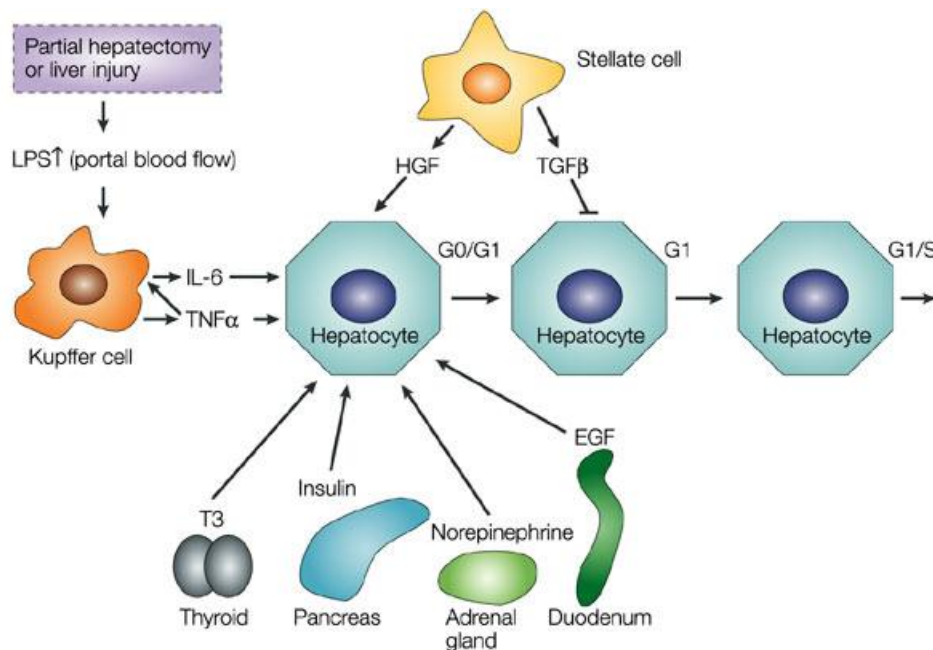
#### **3.2.1. Zellzyklus**

Zelldifferenzierung sowie Zellproliferation beruhen auf einer gut organisierten Steuerung des Zellzyklus, welcher sich in Mitose und Interphase aufteilt. Die Interphase teilt sich wiederum in eine  $G_1$ -Phase (Gap-1 Phase), eine S-Phase (Synthese Phase) und eine  $G_2$ -Phase (Gap-2 Phase) auf. Charakteristisch für  $G_1$ - und  $G_2$ -Phase ist ein ausgeprägtes Zellwachstum, während in der S-Phase die DNA der Zelle repliziert wird. Die M-Phase (Mitose Phase) ist gekennzeichnet durch die Teilung der Chromosomen, des Zellkerns sowie der Zelle an sich (Zytokinese). Die Regulation des Zellzyklus erfolgt sowohl über äußere Faktoren, wie der Zellgröße oder das Nährstoffangebot, als auch über innere Faktoren, wobei besonders Cykline und CDKs (*cyclin dependent kinases*) eine wesentliche Rolle spielen (Blagosklonny et al. 2002; Harbour et al. 1999).

### 3.2.2. Leberregenerationsmodell: Partielle Hepatektomie

Ist die Leberregeneration Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen im Tiermodell, wird häufig das bewährte Modell der partiellen Hepatektomie (PH) angewendet. Dabei werden z.B. der Maus 70% der Leber chirurgisch entfernt, womit die Leberregeneration eingeleitet wird. Entwickelt wurde dieses Modell bereits 1931 durch Higgins und Anderson (Higgins, Anderson 1931). Untersuchungen des Lebergewebes nach der partiellen Hepatektomie erlauben Analysen zur Hepatocytenproliferation *in vivo* und deren Beeinflussung durch Zytokine, Wachstumsfaktoren, sowie das Zusammenspiel von Proteinkomplexen.

Nach der PH treten die adulten Hepatozyten von der quieszenten  $G_0$ -Phase in die  $G_1$ -Phase über, durchlaufen den Zellzyklus und proliferieren. Die Zellen behalten dabei ihre morphologische Struktur und ihre volle Funktionstüchtigkeit bezüglich der Verstoffwechselung von Nährstoffen und Toxinen, ebenso des Harnstoff-Zyklus und der Albuminsynthese bei (Taub et al. 2004). Die Zellen durchlaufen den Zellzyklus im Schnitt 1,66 Mal. Bereits 48 Stunden nach der PH ist der Großteil des entfernten Lebergewebes bereits durch proliferierte Hepatozyten ersetzt worden. Völlig abgeschlossen ist dieser Vorgang nach etwa 7 Tagen. Die ursprüngliche bei Mäusen in 7 Leberlappen angeordnete Form der Leber wird dabei nicht wieder hergestellt, sondern die nach der PH übrig gebliebenen Leberlappen wachsen auf die ursprüngliche Gesamtmasse an (Fausto 2000; Michalopoulos und DeFrances 1997; Koniaris et al. 2003). Auf molekularer Ebene ist die regenerative Antwort der Hepatozyten auf die PH sehr komplex und besteht aus mehreren Stufen. Gestartet wird mit der DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B oder STAT3 und der Aktivierung von Proto-Onkogenen und anderen „frühen“ Genen. Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  sensibilisieren die Hepatozyten für Wachstumsfaktoren, welche den Übertritt von der  $G_0$ -Phase in die  $G_1$ -Phase initiieren (Diehl 2000). Wachstumsfaktoren wie HGF (*hepatocyte growth factor*) und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor-beta*) steuern die weiteren Übergänge innerhalb des Zellzyklus.



### Abbildung 2.2: Leberregeneration nach partieller Hepatektomie

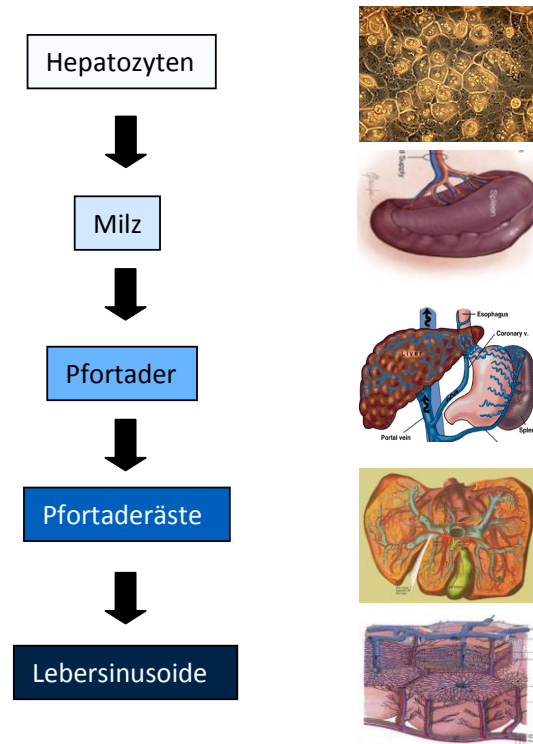
Nach partieller Hepatektomie (PH) wird die Expression von Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Darm erhöht. Dadurch werden Kupffer-Zellen angeregt vermehrt TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 auszuschütten. Durch das Zusammenspiel mit weiteren Faktoren, wie Insulin, Thyroxin, EGF (*epidermal growth factor*), Noradrenalin und durch das von den Sternzellen ausgeschüttete HGF (*hepatocyte growth factor*) geht der Hepatozyt von der G<sub>0</sub> in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus über. Gleichzeitig wird die Expression von TGF- $\beta$  geblockt, welches im ungeschädigten Zustand die DNA-Synthese unterdrückt und den Hepatozyten so in der G<sub>0</sub>-Phase hält (Taub 2004).

### 3.2.3. Leberregenerationsmodell: Hepatozytentransplantation

Experimente zur Transplantation von Hepatozyten in Empfängertiere zur Repopulation einer geschädigten Leber beruhen zunächst auf der erfolgreichen Gewinnung von Spenderzellen. Die ersten Versuche lebensfähige Hepatozyten durch Collagenase-haltige Perfusionslösungen aus einer Rattenleber zu isolieren wurden bereits 1969 unternommen (Berry et al. 1969; Seglen 1976). Darauf aufbauende Transplantationsversuche an der Gunn-Ratte, einem bewährten Tiermodell für das zu Hyperbilirubinämie führende Crigler-Najjar Syndrom, zeigten absteigende Plasma Bilirubin Werte nach erfolgter Hepatozytentransplantation (Groth et al. 1977; Sutherland et al. 1977). Bereits 1998 wurde eine Hepatozytentransplantation an einem

zehn-jährigen Mädchen, welches unter dem Crigler-Najjar Syndrom litt, erfolgreich durchgeführt (Fox et al. 1988). Ebenso zeigten frühe Transplantationsversuche an Dimethylnitrosamin-behandelten (DEN-) Mäusen, dass diese Methode zur Behandlung von schwer geschädigten Lebern eine vielversprechende alternative Therapieoption zu sein scheint (Minato et al. 1984; Sutherland et al. 1977). Die Transplantation der isolierten Hepatozyten erfolgt idealerweise über Injektion in die Milz oder in die Pfortader (Nagata et al. 2003; Rhim et al. 1994). Die Zellen wandern mit dem Blutfluss zu den Lebersinusoiden und übertreten das Endothelium, so dass sie bald im Leberparenchym vor allem in den periportalen Feldern zu finden sind und dort auf bestimmte Zeit die Aufgaben adulter Hepatozyten übernehmen (Ponder et al. 1991; Bumgardner et al. 1998). Im Parenchym bilden sich dann Gap-junctions sowie Gallengangskanälchen zwischen den repopulierenden Zellen aus (Gupta et al. 1999).

Eine Therapie mittels Hepatozytentransplantation ist insofern wiederum problematisch, da die Anzahl der Zellen, die mit einem Mal transplantiert werden können limitiert ist. Wird diese Grenze überschritten, sind thromboembolische Komplikationen möglich, die das Leben des Patienten gefährden. Deshalb liegt der Fokus der heutigen Forschung besonders darauf, Strategien zu entwickeln, die dazu führen, dass transplantierte Spenderzellen sich *in vivo* vermehren und anwachsen.



### Abbildung 2.3: Prinzip der Hepatozytentransplantation

Durch Perfusion und Collagenaseverdau werden aus Spendermäusen Hepatozyten frisch isoliert. Diese werden umgehend in Empfängertiere transplantiert. Die Transplantation sieht die Injektion von  $1 \times 10^6$  Hepatozyten über den Pfortaderweg vor. Dazu werden die Zellen in den oberen Milzpol injiziert. Diese migrieren von dort über die Pfortader zur Leber und verteilen sich in den Lebersinusoiden, wo sie das Endothel übertreten und sich im Parenchym einlagern.

### 3.2.4. Induktion einer Leberschädigung im Rahmen von Regenerationsanalysen

Die Repopulation einer geschädigten Leber durch transplantierte Spenderzellen hängt im Wesentlichen davon ab, wie hoch der Selektionsdruck auf die Spenderzellen und wie gut die Qualität der transplantierten Spenderzellen ist. Beide Faktoren sind für die Proliferation und die Ansiedlung und somit für die erfolgreiche Repopulation immens wichtig. Es ist durchaus möglich den Eingriff der Hepatozytentransplantation zu wiederholen, sollte jedoch, da jedes Mal das Narkoserisiko getragen werden muss, vermieden werden.

Um im Tiermodell einen derartigen Selektionsdruck auf die transplantierten Spenderhepatozyten zu erzeugen, wurden in der Vergangenheit verschiedene Konditionierungen der Empfängertiere vorgenommen. Genetische Manipulationen der Empfängertiere spielen dabei eine große Rolle. So zeigten Hepatozytentransplantationen an einem Mausmodell, welches unter hereditärer Tyrosinanämie leidet (Fah<sup>-/-</sup>, fumaryl acetoacetat Hydrolase), dass bereits eine Menge von 1000 transplantierten Zellen für die Regeneration zu einer funktionsfähigen Leber ausreichend ist (Overturf et al. 1996). Ähnliche Erfolge konnten mit der Transplantation von Maus-Hepatozyten in Albumin-Urokinase Plasminogen Activator (Alb-uPa) transgene Mäuse, welche durch die Überexpression funktionell eingeschränkt sind, erzielt werden (Sandgren et al. 1991; Rhim et al. 1995).

Um einen Stimulus zur Proliferation zu setzen eignet sich prinzipiell die Teilresektion der Leber. Dabei wird die Repopulation der Leber jedoch vorrangig von den residenten Hepatozyten übernommen, da transplantierte Hepatozyten durch ihre Isolation bereits eine geringere Qualität aufweisen. Dadurch ist ihr Beitrag zur Leberregeneration nach PH äußerst gering (Grompe et al. 2001). Um Regenerationsanalysen durch transplantierte Hepatozyten durchführen zu können, muss gewährleistet sein, dass nach dem Setzen eines Proliferationsstimulus - wie durch eine PH - die Spenderzellen den Selektionsvorteil haben. Dazu wurden Behandlungen mit Medikamenten oder physikalische Eingriffe, welche nachhaltige Schädigungen der Leber bewirken, und somit einen Selektionsvorteil für transplantierte Spenderhepatozyten bieten, entwickelt.

Die physikalische Konditionierung der Leber durch Bestrahlung führt zu einer anhaltenden Blockierung des Zellzyklus. Residente Hepatozyten können eine Teilresektion der Leber nicht mehr kompensieren (Malhi et al. 2008; Koenig et al. 2008).

Die chemische Blockierung der Proliferation von residenten Hepatozyten führte nach PH ebenfalls zu einer Leberrepopulation, die durch Spenderzellen vorgenommen wurde. Es zeigte sich, dass das Pyrrolizidin-Alkaloid Retrorsine sich dazu besonders eignet, da es den Zellzyklus residenter Zellen effektiv blockiert (Guha et al. 2001; Laconi et al. 1998; Guo et al. 2002). Analog zu Retrorsine kann das strukturell und molekular ähnlich aufgebaute Monocrotaline angewandt werden, wodurch in Hepatozytentransplantationsstudien residente Hepatozyten ebenfalls effektiv an der Proliferation gehindert wurden (Witek et al. 2005).



Es gibt somit verschiedenste Möglichkeiten Spenderzellen einen Proliferationsvorteil zu den residenten Zellen zu geben. Eine gelungene Repopulation durch die Spenderzellen erlaubt dann weitere Analysen zu grundlegenden Mechanismen der Leberrepopulation durch transplantierte Hepatozyten. Dennoch muss man sich weiterhin bewusst machen, dass es sich hierbei um ein Tiermodell handelt, welches zunächst nur dazu dient, ebendiese Mechanismen aufzuzeigen. Darauf aufbauend können dann humane Therapieverfahren entwickelt werden.

### **3.2.5. Mechanismen der Leberzellproliferation nach Transplantation in Selektionsmodellen**

Im tierexperimentellen Ansatz hat es sich bewährt, die Transplantation der Spenderzellen über das portale Gefäßsystem durchzuführen. Dabei werden die Zellen in die Milz injiziert, welche diese dosiert an die Pfortader abgibt, von wo aus sie auf direktem Wege in die Leber wandern. Dort durchdringen sie das Endothel und wandern durch die Sinusoide ins Leberparenchym. Jedoch nicht alle transplantierten Zellen wachsen hier an und tragen zu Leberrepopulation bei. An der Ratte konnte gezeigt werden, dass lediglich 20-30 % der transplantierten Zellen überhaupt überleben und anwachsen (Rajvanshi et al. 1996). Eine verbesserte Ansiedlung der Zellen konnte durch die Depletierung von Kupffer-Zellen gezeigt werden (Joseph et al. 2002). Die Depletierung hepatischer Stern-Zellen hingegen führte zu vermindertem Anwachsen der Spenderzellen, woraus sich schließen lässt, dass sie einen entscheidenden Beitrag zur Repopulation leisten (Benten et al. 2005).

Die Ansiedlung transplantierter Hepatozyten geht mit immensen Umbaumaßnahmen im Leberparenchym einher. Es ist bisher jedoch noch nicht bekannt welche molekularen Mechanismen der Proliferation transplantierter Zellen zugrunde liegen. Es konnte gezeigt werden, dass expandierende Hepatozyten residente Zellen durch Apoptose verdrängen und somit physisch Platz zur Proliferation schaffen (Oertel et al. 2006).

### **3.3. HGF/c-met Signalweg und das “invasive growth program”**

Die Leberregeneration wird durch eine enorme Anzahl an Wachstumsfaktoren und Zytokinen gesteuert. Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor HGF (hepatocyte growth factor) spielt dabei verstärkt eine Rolle. HGF, das auch unter dem Namen Scatter factor (SF) bekannt ist, ist ein zur Plasminogen-Familie gehörendes Multidomänen-Protein. Die Synthese eines einzelsträngigen Vorläuferproteins findet in mesenchymalen Zellen statt, welches proteolytisch sowohl durch Urokinase, als auch durch Plasminogen Aktivator in ein aktives Heterodimer, bestehend aus einer 69 kDa großen  $\alpha$ -Kette und einer 34kDa großen  $\beta$ -Kette, gespalten wird (Naldini et al. 1992; Mars et al. 1993; Nakamura et al. 1991). Die  $\alpha$ -Kette besteht aus einer N-terminalen Haarschleife sowie aus vier Kringel-Domänen. HGF ist einziger Ligand für den Tyrosin-Kinase-Rezeptor c-Met (*mesenchymal epithelial transition factor*).

Der Rezeptor c-Met wird zunächst in epithelialen Zellen als 1436 Aminosäuren großes Protein synthetisiert und anschließend proteolytisch gespalten. Der Rezeptor besteht aus einer N-terminalen extrazellulären  $\alpha$ -Kette und einer C-terminalen  $\beta$ -Kette, welche aus einer extramembranen Sequenz, einer transmembranen Sequenz und einer zytoplasmatischen Sequenz besteht.

Zunächst wurde gezeigt, dass besonders die erste und zweite Kringeldomäne der N-terminales  $\alpha$ -Kette von HGF sowohl für die spezifische Bindung an seinen Rezeptor c-Met, als auch für die Auslösung der HGF/c-Met spezifischen Funktionen verantwortlich sind (Matsumoto et al. 1991; Mizuno et al. 1994). Spätere mutagenetische Studien konnten zeigen, dass nicht nur Teile der  $\alpha$ -Kette, sondern auch die ersten 212 Stellen der  $\beta$ -Kette für die Bindung des Liganden HGF essentiell sind (Gherardi et al. 2003).

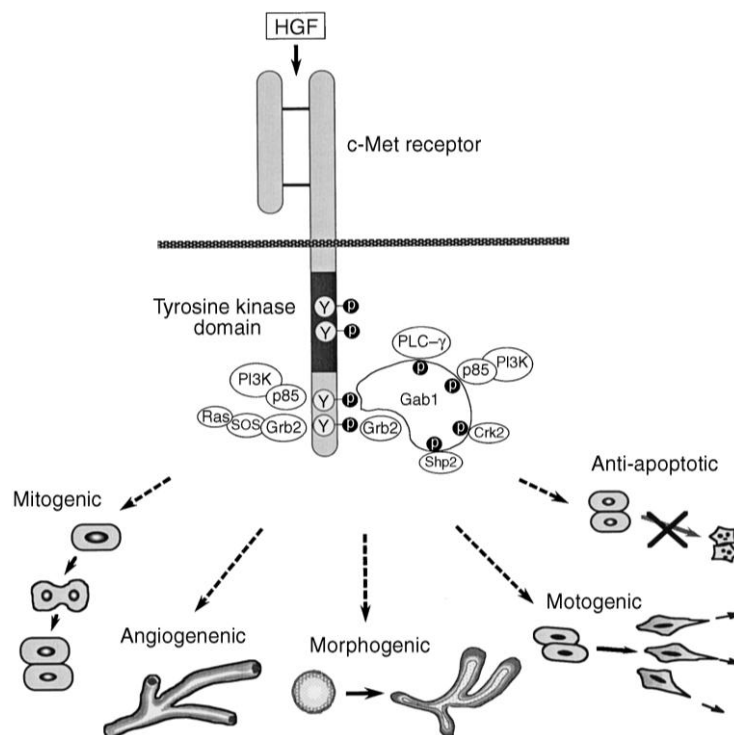
Untersuchungen konnten zeigen, dass HGF und c-Met bereits seit rund 500 Mio. Jahren existieren, woraus sich eine große evolutive Bedeutung schließen lässt (Donate et al. 1994).

Die Bindung von HGF an seinen Rezeptor c-Met bewirkt die Transphosphorylierung der Tyrosine 1234 und 1235, wodurch die Strukturproteine Gab1 (Grb2 associated binding protein) und P120 aktiviert werden. Dadurch wird die Aktivierung verschiedenster Signalwege ausgelöst. Der ERK/MAPK Signalweg beispielsweise übt wichtige Funktionen im Bereich der Differenzierung, Migration und Proliferation aus (Potempa et al. 1998).

Die Aktivierung des Ras/Raf Signalweg führt zu Proliferation (Ridley et al. 1995; Royal et al. 2000) und Aktivierung von STAT3 führt zu Zell-Morphogenese. Apoptose wird über die Aktivierung von Pi3K/Akt geregelt (Fan et al. 2001; Xiao et al. 2001). Sämtliche c-Met abhängige Signalwege führen zu Zell-Verhalten, das auch als das „invasive growth programm“ bekannt ist.

Die Funktionen von HGF/c-Met während der Embryogenese sind vielfältig und reichen von Proliferationsstimulation bis hin zur Generierung von Signalen, die das Überleben der Hepatozyten und der Trophoblasten der Placenta sichern. Die Wichtigkeit dieser Signale zeigt sich sowohl in HGF *knockout* Mäusen als auch in c-Met *knockout* Mäusen. Diese Tiere sind embryonal letal und sterben noch *in utero* (Schmidt et al. 1995; Uehara et al. 1995; Giebeler et al. 2009). Ursächlich für die Letalität sind eine geringere Anzahl von parenchymatösen Zellen sowie eine gestörte muskuloskeletale Entwicklung (Birchmeier et al. 2003; Maina et al. 1999).

Neben den regulierenden Aufgaben normaler Zellfunktionen sind HGF und c-Met wesentlich an der Entstehung maligner Tumore und Metastasen beteiligt. So konnte *in vitro* ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von HGF oder c-Met und dem invasiven Verhalten - wie es bei der Metastasierung von Tumoren zu finden ist - beschrieben werden (Rong et al. 1994; Longati et al. 1994; Sakata et al. 1996). *In vivo* konnte eine erhöhte c-Met Gen-Amplifikation in Lebermetastasen nachgewiesen werden (Zeng et al. 2008; Ueki et al. 1997). Nicht nur die Hepatozyten, auch Zellen epithelialer und mesenchymaler Herkunft, wie Zellen der Milchdrüsen, Melanozyten und auch die quergestreifte Muskulatur zeigten maligne Transformationen bei Überexpression von HGF (Takayama et al. 1997).



**Abbildung 2.4: c-Met/HGF Signalweg**

HGF übt verschiedenste biologische Funktionen bei einer großen Spanne an unterschiedlichen Zelltypen aus. Dies beinhaltet Mitogenese, Angiogenese, Morphogenese, Motogenese und anti-apoptotische Funktionen (Abb. Matsumoto et al. 2001).

### 3.3.1. Die Rolle des HGF/c-Met Signalweges bei der Leberregeneration

Aufgrund der vielfältigen Funktionen, auf die der c-Met/HGF Signalweg Einfluss nimmt, war dieser Signalweg schon mehrfach Gegenstand molekularbiologischer Untersuchungen im Bereich der Leberregeneration. c-Met defiziente Mäuse weisen eine beeinträchtigte Leberregeneration mit erhöhter HGF Expressionen nach partieller Hepatektomie auf (Borowiak et al. 2004). So konnte in einem Rattenmodell beobachtet werden, dass der HGF mRNA Gehalt ab der ersten Minute nach 2/3 Hepatektomie unmittelbar ansteigt (Zarnegar et al. 1991; Stolz et al. 1999). An einem in Ratten durch DEN-ausgelösten Leberzirrhose Modell konnte gezeigt werden, dass die hypoxische Inhibierung von HGF nach PH zu verschlechterter Regeneration führt (Corpechot et al. 2002). Die Behandlung von konditionalen c-Met defizienten Mäusen mit dem Apoptose-induzierenden

Fas-Antikörper zeigte eine massive Sterblichkeit der Tiere durch hämorrhagische Nekrose. Behandelte Wildtyp Tiere hingegen zeigten nur eine leichte Leberschädigung. Die Gabe des krebserregenden Stoffes Tetrachlormethan ( $\text{CCl}_4$ ) führte im gleichen Versuch in den c-Met defizienten Tieren zu deutlich schlechterer Wiederherstellung der Leberstruktur einhergehend mit erhöhter inflammatorischer Antwort (Huh et al. 2004). Aktuelle Studien zeigen eine regulierende Funktion von HGF/c-Met auf den Übergang der G2- in die Mitose-Phase des Zellzyklus durch eine fortwährend erhöhte ERK1/2 Aktivierung während der Leberregeneration (Factor et al. 2010). In Kapitel 3.5.1 wird die konditionale c-Met knockout Maus detaillierter behandelt.

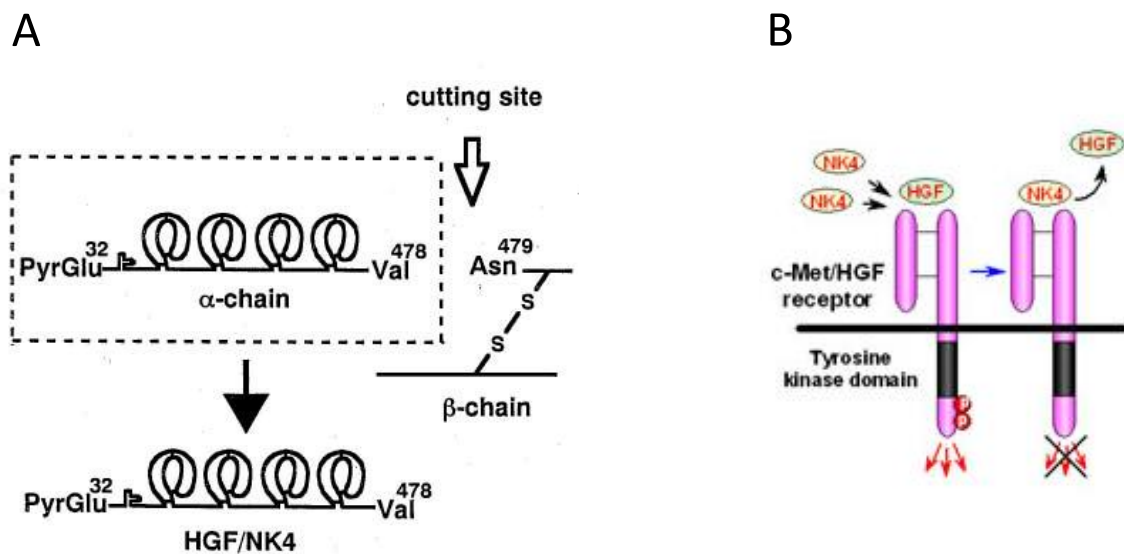
Verschiedenste Studien belegen eine immens wichtige Rolle des HGF/c-Met Signalwegs in Bezug auf die Leberregeneration nach einer Schädigung. Eine Vielzahl an Regenerationsstudien wird an dem Modell der partiellen Hepatektomie durchgeführt und die Regeneration beobachtet. Durch die Transplantation von Spenderzellen muss eine Interaktion zwischen den Spenderzellen und denen des Wirts stattfinden. Das bringt eine Neuordnung der extrazellulären Matrix mit sich. Und genau diese Wechselwirkungen der proliferierenden Zellen mit ihren umgebenen Zellen sind zurzeit nur sehr wenig untersucht.

### **3.3.2. HGF-Antagonist NK4**

Um den Einfluss des HGF/c-Met Signalweges auf die Repopulation nach der Hepatozytentransplantation (HT) zu untersuchen wird zum einen mit genetisch veränderten Mäusen gearbeitet, deren Gen, das für den HGF Rezeptor c-Met codiert, deletiert wird (Cre-loxP System). Zum Anderen kann die Funktion von c-Met durch Inhibitoren unterdrückt werden. Dazu eignet sich z.B. NK4, ein spezifischer HGF-Antagonist, der 1997 identifiziert wurde (Date et al. 1997). NK4 besitzt wie HGF einen N-terminalen hairpin, sowie die 4 Kringel-Domänen der HGF  $\alpha$ -Kette, die  $\beta$ -Kette wird jedoch durch Elastaseverdau abgetrennt. NK4 bindet kompetitiv an den c-Met Rezeptor ohne aber die Phosphorylierung der Tyrosine zu initiieren. Dadurch wird die HGF-induzierte Zellproliferation, -migration und -invasion inhibiert (Date et al. 1997). Adenovirale Überexpression von NK4 unterdrückt das Tumorwachstum und die Angiogenese in Magen-, Darm- sowie in Leberzellkarzinomen (Heideman et al. 2004, 2005; Son et al. 2006; Jie et al. 2007). Zudem inhibiert NK4 auch Angiogenese, die durch den vascular endothelial growth factors (VEGF) induziert wird (Nakabayashi et al. 2003).

Die weitreichende Wirkung der HGF Antagonisierung durch NK4 zeigt, dass es sich hier um einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt im Bereich der Tumorbehandlung handelt, der es wert ist weiter erforscht zu werden.

Auch im Bereich der Hepatozytentransplantation stellt die Behandlung mit NK4 einen interessanten Ansatzpunkt dar, da mit NK4 ein funktioneller *knockout* von c-Met initiiert wird.



**Abbildung 2.5: Struktur und Funktionsweise des c-Met Inhibitors NK4**

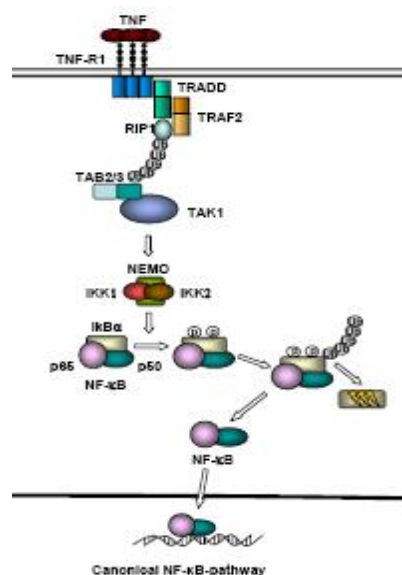
**A:** HGF, bestehend aus einer α- und einer β-Kette, wird durch Elastase verdaut. Dabei entsteht die N-Terminale hairpin Domäne und die vier zusammenhängenden Kringeldomänen, welche als NK4 bezeichnet werden. NK4 beinhaltet die c-Met Rezeptor Bindungsdomäne (Abb. Date et al. 1997). **B:** NK4 bindet kompetitiv an den Rezeptor c-Met, ohne jedoch seine Phosphorylierung zu initiieren. Dadurch wird er auch als HGF Antagonist bezeichnet (Abb. kringle.pharma.com).

### 3.4. Die Bedeutung von NFκB in der Leber

Der ubiquitär vorkommende Transkriptionsfaktor NFκB (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) spielt für die Leberregeneration ebenfalls eine entscheidende Rolle. Bereits 30 Minuten nach PH sind Translokationen in den Zellkern beobachtet worden (FitzGerald et al. 1995). Sämtliche Studien bringen eine Störung des NFκB-Signalweges mit der Entstehung von Krebs, Arteriosklerose und Diabetes in Verbindung (Bonizzi et al. 2004; Courtois et al. 2006; Karin et al. 2000, 2005, 2006). NFκB kann über zwei unterschiedliche Wege aktiviert werden. Der klassische, auch kanonische Signalweg wird durch pro-inflammatorische Zytokine wie TNF-α, durch virale Infektion, oder

im Tiermodell auch als Antwort auf LPS (Lipopolysaccharide) Stimulation in Gang gesetzt. Dadurch wird der IKK-Komplex aktiviert, welcher sich aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  sowie der regulatorischen Untereinheit IKK $\gamma$ , auch NEMO (*NF $\kappa$ B essential modifier*) genannt, zusammensetzt (Yamaoka et al. 1998; Zandi et al. 1997). Der IKK-Komplex phosphoryliert dann wiederum den Inhibitor von NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B, welcher proteosomal degradiert wird und NF $\kappa$ B nicht weiter blockiert. NF $\kappa$ B wandert in den Zellkern und vermittelt hier die Expression der Zielgene.

Die alternative Aktivierung von NF $\kappa$ B wird durch Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie und deren Liganden, wie CD40-Lymphotoxin- $\beta$ -Rezeptoren und BAFF (*B-cell activating factor of the TNF family*) vermittelt (Karin et al. 2002; Perkins 2003).



### Abbildung 2.6: Klassischer NF $\kappa$ B Signalweg

Die Bindung von pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, aber auch die Behandlung mit LPS, einer Komponente aus der Bakterienzellwand, führt zur Phosphorylierung und proteosomalen Degradierung von I $\kappa$ B, dem NF $\kappa$ B Inhibitor. Dadurch kann NF $\kappa$ B nun in den Zellkern wandern und dort an die Ziel-DNA binden (Abb. Vucur et al. 2010).

### **3.5. Technik der konditionalen knockout-Maus**

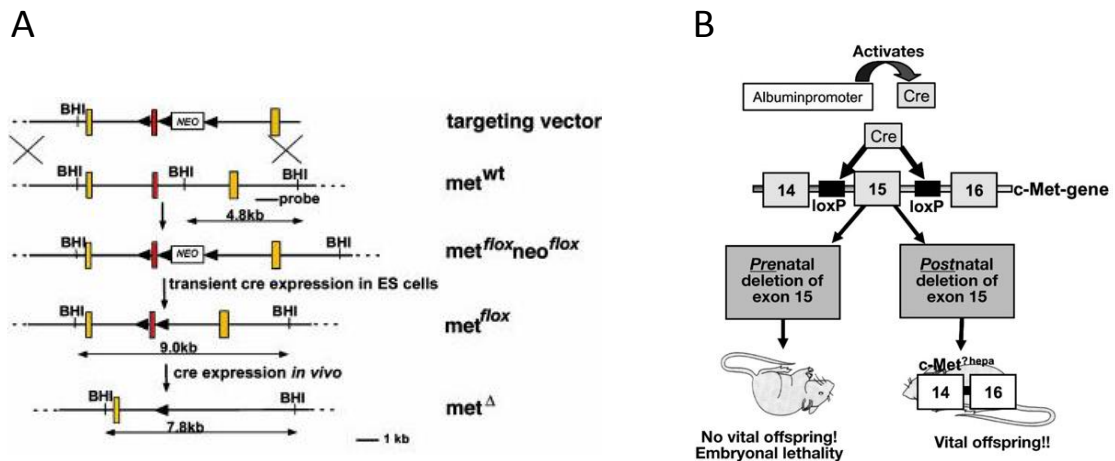
Molekularbiologische Grundlagenforschung im Bereich der Medizin wird häufig am Modellorganismus Maus durchgeführt. Durch die günstigen Haltungskosten, eine schnelle Generationenfolge von drei Wochen sowie zuverlässige und hohe Reproduktionsraten der Tiere bewähren sie sich als ideales experimentelles Tiermodell. Dadurch wurden Mäuse zum bestuntersuchten Organismus, der dem Menschen am nächsten steht. 1989 wurde die erste konditionale *knockout*-Maus von Evans, Capecchi und Smithies kreiert, die dafür mit dem Nobelpreis für Physiologie ausgezeichnet wurden. Üblicherweise werden konditionale *knockout*-Mäuse mit dem Cre („Causes REcombination“)/LoxP System generiert. Das Enzym Cre-Rekombinase entfernt spezifische DNA Sequenzen, die von zwei Erkennungssequenzen, den sog. LoxP-Seiten, flankiert sind (Hamilton and Abremski. 1984). Die Expression der Cre-Rekombinase unter einem definierten Promotor kontrolliert den Zeitpunkt und auch den Ort des genetischen *knockouts* während der embryonalen Phasen. Die Cre-Expression unter dem in unseren Experimenten verwendeten Albuminpromoter AlfpCre führt beispielsweise ausschließlich zu hepatozytenspezifischen *knockout*-Tieren (Kellendonk, Opherk et al. 2000).

#### **3.5.1. Die konditionale c-Met *knockout* Maus**

Um die Rolle von c-Met/HGF bei der Leberrepopulation in dem hier angewendeten Modell zu definieren wurden die Experimente mit konditionalen c-Met *knockout*-Mäusen durchgeführt. Konditionale Met *knockout*-Mäuse wurden durch ein gefloxtes Met Allel (Met<sup>flox</sup>) durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen generiert. Die LoxP Seiten flankieren dabei Exon15 welches für die ATP-bindende Region kodiert. Das Vorhandensein zweier LoxP Seiten alleine hat keinen Einfluss auf die Funktionstüchtigkeit des Allels. Die Mäuse sind fertil und zeigen keine histologischen Abnormalitäten. Die Kreuzung mit Cre-Rekombinase positiven Tieren führt zu konditionalen c-Met defizienten Nachkommen welche noch im Embryonalstadium sterben (Borowiak et al. 2004). Die Lethalität kann zum Einen umgangen werden indem c-Met gefloxt Mäuse mit Tieren verpaart werden deren Cre-Expression durch plpC induziert werden kann (Kühn et al. 1995). Eine andere Möglichkeit ist die Cre-Rekombinase Expression unter der Kontrolle eines für die Maus spezifischen Albumin regulatorischen Promotors und einem  $\alpha$ -Fetoprotein enhancers (AlfpCre Transgen) stattfinden zu lassen (Kellendonk et al. 2000). Da Mäuse, deren c-Met



Rezeptor bereits während der Embryogenese deletiert wird nicht lebensfähig sind, wurde zur Generierung konditionaler c-Met *knockout*-Mäuse ein Promotor verwendet, der erst 14 Tage nach Geburt der Tiere aktiviert wird und so die Embryosterblichkeit verhindert (Giebeler et al. 2009).

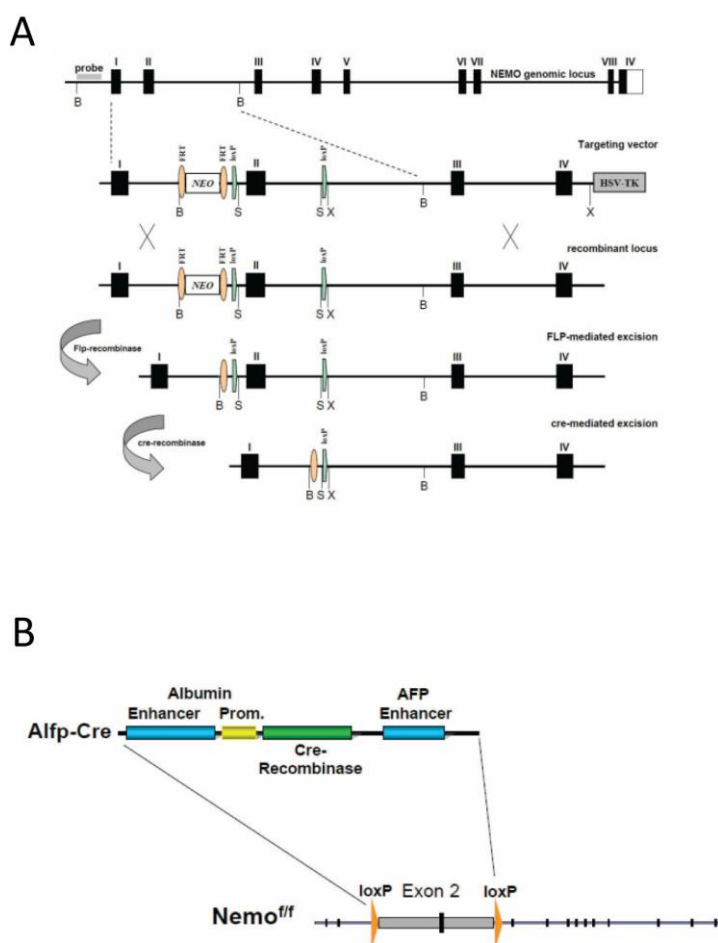


### Abbildung 2.7: c-Met *knockout* Strategie

**A:** Exon 15, welches für die ATP-bindende Region im c-Met Rezeptor kodiert (hier in rot dargestellt), wird durch zwei loxP Seiten (Pfeilspitzen) flankiert. Exons 14 und 16 sind gelb markiert (Abb. Borowiak et al. 2004). **B:** Expression dieses Konstruktes unter einem Albuminpromoter. Die pränatale Expression führt zu einem Sterben der Embryonen *in utero*. Wird die Cre-Rekombinase aufgrund eines späten, erst 14 Tage nach Geburt aktiven Albuminpromoters, spät aktiviert und führt auch erst in der zweiten Lebenswoche zu konditionalen *knockout*-Mäusen, so entstehen lebensfähige konditionale c-Met *knockout*-Mäuse (Abb. Giebeler et al. 2009).

### 3.5.2. Die konditionale NEMO *knockout* Maus

NEMO-defiziente Mäuse zeigen massiven Leberschaden durch Apoptose und sterben im Embryonalstadium E12,5 - E13 (Rudolph, Yeh et al. 2000). Deshalb ging man auch hier dazu über, konditionale Knockout Mäuse zu generieren. Tiere, deren NEMO Gen durch LoxP Seiten flankiert war, wurden mit Tieren, die transgen sind für die Expression der Cre-Rekombinase unter einem Albumin Promotor, verpaart. Cre-Rekombinase-positive Mäusen fehlt dann Exon 2, was zu Mäusen mit Nullallel für NEMO führt. Cre-Rekombinase-negative Mäuse tragen ein voll funktionstüchtiges NEMO Allel.



**Abbildung 2.8: NEMO *knockout* Strategie**

**A:** Zur Generierung einer konditionalen NEMO *knockout*-Maus wurde Exon 2, welches die genetische Information für die regulatorische Untereinheit NEMO beinhaltet, von zwei LoxP Seiten (grüne vertikale Felder) flankiert. Exons werden als schwarze Kästchen dargestellt, Introns als horizontale Linien (Abb. Malato 2009). **B:** Die Expression der Cre-Rekombinase erfolgte unter einem späten (Aktivierung 14 Tage nach Geburt) Albuminpromotor. Dadurch wird der für NEMO kodierende Teil, Exon 2, an den LoxP Seiten eliminiert (Abb. Malato 2009).

### **3.6. Ziel dieser Studie**

Ziel dieser Studie ist es, die Repopulation der Leber durch transplantierte Spenderhepatozyten im Mausmodell genauer zu analysieren. Dabei soll speziell die Rolle des c-MET/HGF Signalsystems genauer untersucht werden.

Aufgrund eines erheblichen Mangels an Spenderorganen ist die Entwicklung alternativer Therapiemethoden zur Organtransplantation aktueller denn je. Die Transplantation isolierter Hepatozyten stellt eine vielversprechende Methode dar, da hier Zellen eines Spenders auf mehrere Empfänger verteilt werden können, was vor allem das Problem des Organmangels verringern würde. Aufgrund der Limitierung der Zahl an transplantierbaren Zellen in Relation zur Organgröße ist es notwendig, eine erhöhte Proliferation der transplantierten Zellen zu gewährleisten. Diese Studie setzt an dem Punkt an, die Repopulation nach Hepatozytentransplantation besser zu verstehen und eventuell einen Ansatzpunkt für mögliche proliferationsstimulierende Therapien zu entwickeln.

Das hier angewendete *in vivo* Mausmodell besteht aus einer Bestrahlung (12Gy) mit anschließender Knochenmarkstransplantation, der Behandlung der Tiere mit dem Proliferationshemmer Retrorsine, einer Teilresektion der Leber und der anschließenden Transplantation von Spenderhepatozyten, die mit einem transgenen Markerprotein konjugiert sind.

Um die Rolle von c-Met/HGF in diesem Rahmen zu untersuchen, kommen konditionale c-Met *knockout* Mäuse sowohl als Empfängertiere als auch als Spendertiere zum Einsatz. Zur Markierung transplanteder Zellen werden c-Met *knockout* und c-Met WT Mäuse mit transgenen humanen alpha-1 Antitrypsin (hAAT) Mäusen gekreuzt. Dieses Markerprotein wird unter der Kontrolle eines Albuminpromoters spezifisch in Hepatozyten exprimiert. Der Repopulationserfolg wird anhand der Expression des Markerproteins gemessen. Näher beleuchtet wird die Repopulation durch Analysen von Proliferation, Apoptose und Umbaumechanismen im Lebergewebe. Dabei wird ein besonderer Fokus auf die Lokalisation bzw. Herkunft der Zellen gelegt.

Im Weiteren wird das etablierte Transplantationsmodell auf ein bereits etabliertes Fibrose-Modell (NEMO *knockout* Maus) angewendet und untersucht, ob es sich zur Repopulation der geschädigten Leber eignet.

Der letzte Schritt beinhaltet einen ersten Ansatz auf therapeutischer Ebene durch medikamentöses Ausschalten des c-Met Rezeptors.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Instrumente

| <b><i>Instrument</i></b> | <b><i>Modell</i></b>              | <b><i>Firma</i></b> |
|--------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| Blot-Kammer              | Semi-Dry-Blotter MAXI             | Roth                |
| Gelkammer                | Minigel Twin                      | Biometra            |
| Inkubator                | Heraeus BB6220                    | Heraeus             |
| Kühlzentrifuge           | Kühlzentrifuge 4517R              | Eppendorf           |
| Kryostat                 | HM550                             | Thermofischer       |
| Mikroskop                | Axiolmager Z1                     | Carl Zeiss          |
| Perfusionspumpe          |                                   | Ismatec             |
| pH-Meter                 | PB-11                             | Sartorius           |
| Photometer               | ELISA reader µQuant               | BIO-TEK             |
| Pipetus                  | Pipetus-akku                      | Hirschmann          |
| Pipetten                 | Eppendorf research                | Eppendorf           |
| Power supply             | Electrophoresis Power supply 600  | Pharmacia Biotec    |
| Real-time PCR            | 7300 Real-time PCR System         | AppliedBiosystems   |
| Software Real-time       | Sequence detection software 1.3.1 | AppliedBiosystems   |
| Sterilbank               | BSB6A                             | Gelaire Flow        |
| Thermocycler             | Thermocycler T3000                | Biometra            |
| Thermomixer              | Thermomixer compact               | Eppendorf           |
| Tischzentrifuge          | Heraeus Pico 17 centrifuge        | Heraeus             |
| Ultra-Turrax             |                                   | IKA                 |
| Vortexer                 | Vortex Genius 3                   | IKA                 |
| Zentrifuge               | Heraeus-Kendro Megafuge 1.0R      | Heraeus             |

## 4.2. Verbrauchsmaterialien

### 4.2.1. Verbrauchsmaterialien

| <b><i>Material</i></b>      | <b><i>Bezeichnung</i></b>     | <b><i>Firma</i></b> |
|-----------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Kryomold                    | Cryomold standard 4557        | Sakura              |
| Kryoröhrchen                | CryoTube Vials                | Nunc                |
| Glaskapillaren              | Soda Klarglaskapillare        | Hilgenbrand         |
| Objektträger                | SuperFrost                    | Roth                |
| Zellsiebe                   | 70µm Nylon cell strainer      | Falcon              |
| Gefäß (15-50 ml)            |                               | Falcon              |
| Reaktionsgefäß (1,5-2ml)    |                               | Eppendorf           |
| 0,5 ml Reaktionsgefäß       | Multiply-µStrip Pro 8er Kette | Sarstedt            |
| Immunomodule                | F16 Maxisorp Immuno Module    | Nunc                |
| 96-well Platte (RNA)        |                               | Greiner             |
| 96-well Platte (Protein)    |                               | Greiner             |
| 96-well Platte (realtime)   |                               | StarLab             |
| Blutabnahmeröhrchen         | Probengefäß 1,1 ml Z-Gel      | Sarstedt            |
| Sterile Pipetten (5-50ml)   |                               | Sarstedt            |
| Pipettenspitzen             |                               | Biozym              |
| Polyvinyl-fluoride Membrane |                               | Bio-Rad             |

### 4.2.2. Erst-Antikörper

| <b><i>Antikörper</i></b>  | <b><i>Spezies</i></b> | <b><i>Bestellnummer</i></b> | <b><i>Firma</i></b> |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------|
| Anti-α1-anti Trypsin      | Kanninchen            | 20R-AR2009                  | Fitzgerald          |
| Anti-human α1-Antitrypsin | Kanninchen            | A0409                       | Sigma               |
| Anti-CD11b                | Ratte                 | 550282                      | BD Pharmingen       |
| Anti- Collagen            | Ratte                 | C7661                       | Sigma-Aldrich       |
| Anti -α -SMA              | Maus                  | A2547-2                     | Sigma-Aldrich       |
| Anti-F4/80                | Ratte                 | MCA497GA                    | AbD Serotec         |
| Anti-Ki67                 | Rabbit                | NCL-Ki67p                   | Nova Castra Lab.    |

|                        |            |           |                 |
|------------------------|------------|-----------|-----------------|
| Anti-Ly6G              | Ratte      | 550291    | BD Pharmingen   |
| Anti-pJNK              | Kanninchen | 4668S     | Cell Signalling |
| Anti-STAT3             | Kanninchen | SC482     | Santa Cruz      |
| Anti-pSTAT3 (Tyr 705)  | Kanninchen | 9131      | Cell Signaling  |
| Anti-AKT               | Kanninchen | 9272      | Cell Signaling  |
| Anti-pAKT              | Kanninchen | 9271      | Cell Signaling  |
| Anti-GAPDH             | Maus       | MCA4739   | AbD Serotec     |
| Anti- $\beta$ -Catenin | Ratte      | 610154    | BD Bioscience   |
| Anti Ki67              | Kanninchen | NCL-Ki67p | Nova Castra     |

#### 4.2.3. Zweit-Antikörper

| <b><u>Antikörper</u></b>                    | <b><u>Bestellnummer</u></b> | <b><u>Firma</u></b> |
|---------------------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG        | A 110088                    | Invitrogen          |
| Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG         | A 11029                     | Invitrogen          |
| Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit IgG      | 404239                      | Invitrogen          |
| Goat $\alpha$ 1-Anti-Trypsin HRP konjugiert | RDI-A1ATRYP-HRP             | Fitzgerald          |
| Anti-goat HRP                               | P044901                     | Dako                |
| Anti-mouse HRP                              | SC74088                     | Santa Cruz          |

#### 4.2.4. Chemikalien, Puffer und Enzyme

| <b><u>Chemikalien</u></b>          | <b><u>Firma</u></b> |
|------------------------------------|---------------------|
| Aceton                             | Fischar             |
| Agarose                            | Serva               |
| APS, Ammoniumpersulfat             | Roth                |
| BSA (Bovines Serum Albumin)        | Sigma               |
| $\beta$ -Mercaptoethanol           | Appllichem          |
| BrdU (5-bromo-2-deoxyuridine)      | AppliChem           |
| Calibrator 4 (Human refence serum) | Diasorin            |
| Chloroform                         | Merck               |
| Collagenase Typ 1                  | Worthington         |

|                                                |                  |
|------------------------------------------------|------------------|
| Complete Mini® (Proteinase Inhibitor Cocktail) | Roche            |
| Diaminobenzidin (DAB)                          | Sigma            |
| DNase 1 Puffer 10x                             | Invitrogen       |
| Diethyl pyrocarbonat (DEPC)                    | Ambion           |
| EDTA 25 mM                                     | Invitrogen       |
| Einbettmedium für Kryoschnitte (Tissue-Tek)    | Sakura           |
| Eosin                                          | Sigma-Aldrich    |
| Ethanol                                        | AppliChem        |
| Ethidiumbromid                                 | Roth             |
| Formaldehyd (37%)                              | Fischar          |
| Glucose                                        | AppliChem        |
| Glycin                                         | AppliChem        |
| Goat Serum                                     | PromoCell        |
| Haematoxinilin                                 | Roth             |
| Hepes                                          | Merck            |
| Isopropanol                                    | AppliChem        |
| Magermilchpulver                               | AppliChem        |
| Methanol                                       | J.T. Baker       |
| Monosodium Phosphat                            | Roth             |
| NaCl                                           | AppliChem        |
| Natriumborat                                   | Merck            |
| Natriumfluorid                                 | Serva            |
| Paraformaldehyd                                | Roth             |
| peqGold                                        | peqLab           |
| Phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF)          | Roth             |
| Pikrinsäure                                    | Apotheke des UKA |
| Polyacrylamid                                  | Roth             |
| Ponceau                                        | Sigma            |
| Red Taq Ready Mix                              | Sigma            |
| RNase away                                     | Roth             |
| Salzsäure, HCL (20%)                           | KMF Laborchemie  |
| SDS (Dodecylsulfat)                            | Roth             |

## Material und Methoden

---

|                                      |               |
|--------------------------------------|---------------|
| SBR GreenER qPCR Super Mix           | Invitrogen    |
| TEMED                                | Serva         |
| Tetramethylbenzidine substrate (TMB) | Sigma Aldrich |
| Tris                                 | AppliChem     |
| Triton X-100                         | Serva         |
| Trypan Blau Färbung                  | Gibco         |
| Trypsin Inhibitor                    | Sigma         |
| TUNEL Kit                            | Roche         |
| TUNEL Label Mix                      | Roche         |
| Tween20                              | Sigma         |
| Vectashield Mounting Medium mit Dapi | Vector        |
| Vitroclud                            | Langenbrinck  |
| Xylol                                | Roth          |

### **Puffer und Seren**

### **Firma**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| TAE Puffer 10x      | Gibco   |
| HBSS                | Gibco   |
| EBSS                | Gibco   |
| EBSS (+Mg, +Ca)     | Gibco   |
| PBS 10x             | PAA     |
| PBS 1x              | PAA     |
| Williams E Medium   | Gibco   |
| SDS Laufpuffer 10x  | Roth    |
| Fetales Kälberserum | PAA     |
| Mausserum           | Jackson |

### **Enzyme**

### **Firma**

|                                          |             |
|------------------------------------------|-------------|
| Proteinase K                             | AppliChem   |
| Collagenase 1                            | Worthington |
| DNase 1                                  | Invitrogen  |
| Deoxyribonuclease I, Amplification Grade | Invitrogen  |
| SYBR® GreenER qPCR SuperMix              | Invitrogen  |



**Materialien/Medikamente für Tierversuche**

**Firma**

|                                         |               |
|-----------------------------------------|---------------|
| Isofluran (Forene®)                     | Abbott        |
| Buprenorphin (Temgesic®)                | essex pharma  |
| Ketamin (Ketamin®)                      | CEVA          |
| Xylazin (Rompun®)                       | Medistar      |
| Heparin                                 | Ratiopharm    |
| Trypsin Inhibitor                       | Sigma         |
| Retrorsine                              | Sigma         |
| Borgal (24%)                            | Virbac        |
| Operationsbesteck                       | F.S.T.        |
| Spritze (0,30mm x 12mm)                 | Braun         |
| Spritze (0,45mm x 10mm)                 | BD Plastipak  |
| Nadeln (22G)                            | BD Microlance |
| Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)              | AppliChem     |
| Soda-Klarglas-Kapillare für Blutabnahme | Hilgenberg    |
| Nahtmaterial Vicryl®, absorbable 4-0    | Ethicon       |

**4.3. Kits**

**Kit**

**Firma**

|                                                       |        |
|-------------------------------------------------------|--------|
| Omniscript RT Kit                                     | Qiagen |
| In situ cell death detection kit, Fluorescein (TUNEL) | Roche  |

**4.4. Experimentelle Tierarbeiten**

**4.4.1. Verwendete Mäusestämme**

In dieser Studie soll die Rolle von c-Met, dem Rezeptor von HGF (hepatocyte growth factor), nach Hepatozytentransplantation (HT) untersucht werden. Für die Versuche werden c-Met defiziente Mäuse verwendet. Die Defizienz des Rezeptors wird über das konditionale Cre loxP System erreicht. Der Rezeptor c-Met enthält als Transmembranrezeptor eine ATP-Binderegion, welche auf dem Exon 15 codiert ist. In den hier verwendeten Mäusen ist Exon

15 von 2 loxP-Seiten flankiert. Cre-Rekombinase wird in diesen Mäusen unter einem postnatalen hepatozytenspezifischen Albuminpromoter 2 Wochen nach der Geburt exprimiert.

Weiterhin werden Spenderzellen aus humanen alpha 1-Antitrypsin (hAAT)-transgenen Spendertieren gewonnen. Das Spenderzell-Markerprotein hAAT wird hepatozytenspezifisch unter der Kontrolle des alpha 1-Antitrypsin Promoters exprimiert (Shen et al. 1987).

Außerdem werden konditionale NEMO-*knockout* Mäuse, welche durch Beeinträchtigung des NFkB Signalweges fibrosierende Lebern entwickeln, für die Anwendung des HT-Modells verwendet. Für diese Applikation werden hAAT(+) Spenderzellen aus konditionalen Caspase8-*knockout* Mäusen gewonnen, welche resistent gegen Apoptose sind (Liedtke et al. 2011).

Die Mäuse wurden in der Versuchstierkunde der Universitätsklinik der RWTH Aachen unter 12h Tag/Nacht Zyklus und Temperaturkontrolle mit Futter und Wasser *ad liquidum* gehalten.

#### **4.4.2. Blutentnahme**

Um die Serum hAAT-Werte zu untersuchen werden den transplantierten Mäusen Blutproben entnommen. Die Blutabnahme erfolgt retro-orbital, eine Methode, die sich als schnell und tiergerecht herausgestellt hat. Dazu wird die Maus für wenige Sekunden mit Isofluran begast um Augenverletzungen durch Zucken des Tieres während der Abnahme zu vermeiden. Mit einer kleinen Glaskapillare wird der Venenkomplex hinter dem Auge von der Innenseite des Auges her angestochen und wenige Tropfen gesammelt. Das Blut wird bei 10.000 g zentrifugiert, das Serum abgenommen und bei -20°C gelagert.

#### **4.4.3. Induktion einer Leberschädigung durch Bestrahlung**

Eine Schädigung der Leber ist Grundlage für die experimentelle Hepatozyten-Transplantation. Die Schädigung wird initial durch Gamma-Bestrahlung mit 12 Gray erreicht. Dazu werden Mäuse im Alter von 6-10 Wochen in spezielle Plexiglasboxen (5 cm X 10 cm) gesetzt. Die Bestrahlung erfolgt in der Abteilung für Strahlentherapie im Universitätsklinikum Aachen. Für die ausschließlich abdominale Bestrahlung ohne Extremitäten, werden die Mäuse mittels Ketamin/Xylazin Injektion in eine leichte Narkose gelegt und in die

entsprechenden Plexiglasboxen gelegt. Dadurch werden ein Drehen der Mäuse und eine damit verbundene ungewollte Bestrahlung anderer Körperbereiche, besonders der Extremitäten, vermieden.

#### **4.4.4. Isolation von Knochenmark**

Die Isolation und Aufarbeitung des Knochenmarks erfolgt idealerweise unmittelbar vor der Transplantation. Die Spendermaus wird mittels zervikaler Dislokation getötet und die Hinterbeine mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Die Haut der Hinterbeine wird geöffnet, Femur und Tibia freigelegt. Aus den Röhrenknochen wird mit einer 22-G-Nadel mit HBSS (+2% FCS) das rote Knochenmark in ein 50 ml Falcon gespült. Das Knochenmark wird mit einer 10 ml Pipette resuspendiert und durch ein 70 µm Sieb pipettiert. Die Zellen werden bei 1500 g und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Danach werden die Zellen erneut in HBSS + 2% FCS gewaschen. Die Zellzahl wird in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen zur anschließenden Transplantation auf  $1 \cdot 10^6/100\mu\text{l}$  verdünnt.

#### **4.4.5. Knochenmarkstransplantation**

Vier Stunden nach Bestrahlung wird eine Knochenmarkstransplantation an den Empfängermäusen durchgeführt. Die Transplantation der Knochenmarkszellen erfolgt über intravenöse Injektion in die Schwanzvene. Dazu werden die Mäuse in einem Maustracer fixiert und der Schwanz zur Vasodilation in warmem Wasser erwärmt.  $1 \cdot 10^6$  Zellen in 100 µl HBSS werden intravenös gespritzt (27 G Nadel). Infektionen werden durch die 2-wöchige Gabe von Antibiotika-haltigem (Borgal) Trinkwasser vorgebeugt.

#### **Antibiotisches Wasser**

Borgal (24%) 400 µl  
ad 1l H<sub>2</sub>O

#### **4.4.6. Partielle Hepatektomie**

Zum Setzen eines Proliferationsstimulus wird eine  $\frac{3}{4}$  Hepatektomie bei den Empfängertieren durchgeführt. Dazu wird die Maus mit 150 µl Xylazinhydrochlorid/Ketaminhydrochlorid in eine leichte Narkose gesetzt. Die tiefe Narkose wird mit Begasung durch Isofluran erreicht. Man beginnt mit der Eröffnung des Bauchraumes und lokalisiert die Leber. Zunächst wird der linke anterior (mediane)

Leberlappen möglichst an der Wurzel ligiert und entfernt. Genauso geht man mit der Entfernung des rechten und linken lateralen Leberlappens vor. Peritoneum und Bauchhaut werden getrennt zugenäht und die Maus wird postoperativ mit Temgesic® zur Schmerzstillung behandelt.

### Narkose

|         |        |
|---------|--------|
| Ketamin | 450 µl |
| Xylazin | 50 µl  |
| NaCl    | 4,5 ml |

#### **4.4.7. Isolation primärer Hepatozyten**

Eine der grundlegenden Methoden dieser Arbeit ist die Transplantation von Leberzellen. Idealerweise werden dazu frisch isolierte primäre Hepatozyten verwendet. Um die Isolierung von primären Hepatozyten möglichst steril zu gestalten werden die OP-Fläche sowie die Pumpe und der Schlauch vorher mit 70% Ethanol desinfiziert. Zum Säubern wird der Schlauch mit PBS gespült. Die Maus wird mit 450 µl Xylazinhydrochlorid/Ketaminhydrochlorid narkotisiert. Zusätzlich werden 300µl Heparin i.p. injiziert um die Blutgerinnung zu minimieren. Mittels einer Laparotomie wird die *vena cava inferior* freigelegt. Die Vene wird mit einem Venenverweilkatheters kanüliert und dieser mit einer Schlaufe fixiert. Die *Vena Portae* wird durchtrennt und unmittelbar darauf die Leber mit 30 ml Puffer A retrograd perfundiert. Die Pumpe wird dabei auf 5 ml/min eingestellt. Im zweiten Schritt wird die Leber mit Puffer B gespült. Der Dritte Perfusionspuffer enthält Collagenase, wodurch die Leberstruktur verdaut wird. Es wird mit 100 ml Puffer C perfundiert. Alle Puffer sollten vorher auf eine Temperatur von 37°C gebracht werden. Ist die Leber ausreichend verdaut, wird sie aus der Maus entnommen und in eine Petrischale in gekühltes Williams E Medium gelegt. Mit Hilfe von sterilen Pinzetten und Scheren wird die Kapsel der Leber angekratzt und die Hepatozyten werden herausgewaschen. Anschließend werden die Hepatozyten durch ein 70 µm Zellsieb gegeben und in einem 50 ml Gefäß aufgefangen und anschließend bei 500 rpm und 4°C 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird unter der Sterilbank abgenommen und verworfen. Das Pellet, in dem sich die Zellen befinden wird in 10 ml William E Medium gewaschen. Das Überleben der Zellen sowie die Zellzahl wird mit der Neubauer-Zählkammer und einer Trypan Blau Färbung bestimmt. Für

die darauf folgende Hepatozytentransplantation werden die Zellen auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen / 100  $\mu$ l gebracht.

| <b><i>Puffer</i></b> | <b><i>Inhaltsstoffe</i></b> | <b><i>Volumen</i></b> |
|----------------------|-----------------------------|-----------------------|
| A                    | EBSS ohne Mg und Ca         | 30 ml                 |
|                      | EGTA                        | 250 $\mu$ l           |
| B                    | EBSS mit Mg und Ca          | 30 ml                 |
|                      | Hepes                       | 10 mM                 |
| C                    | EBSS mit Mg und Ca          | 100 ml                |
|                      | Hepes 10 mM                 | 10 mM                 |
|                      | Collagenase 1               | 40 mg                 |
|                      | Trypsin Inhibitor           | 4 mg                  |

#### **4.4.8. Hepatozytentransplantation**

Die Hepatozytentransplantation (HT) schließt idealerweise unmittelbar an die Isolation der primären Hepatozyten an. Die Empfängerermäuse werden jeweils zehn Minuten vor dem Eingriff durch eine i.p. Injektion von 150  $\mu$ l Xylazinhydrochlorid/-Ketaminhydrochlorid in eine schwache Narkose gelegt. Unmittelbar vor der Transplantation werden sie mittels eines Isofluranverdampfers in eine tiefe Narkose gebracht. Eine linksseitige Laparotomie wird durchgeführt und die Milz lokalisiert. Es werden  $1 \cdot 10^6$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu$ l Williams E Medium in den oberen Milzpol injiziert. Das an der Milz befindliche Fett dient dabei zum Fixieren der Milz mit einer Pinzette während der Injektion. Unmittelbar nach dem Entfernen der Nadel aus der Milz muss der obere Milzpol rund um die Einstichstelle ligiert werden, um ein Verbluten der Maus zu vermeiden. Ohne Ligation könnte dies sehr schnell geschehen, da durch die injizierten Zellen ein erhöhter Druck in der Milz entsteht und diese dadurch zu erhöhter Blutung tendiert. In die Bauchhöhle werden 400  $\mu$ l Temgesic® zur nachoperativen Schmerzstillung gegeben. Die Milz wird mit Hilfe von sterilen Tupfern vorsichtig wieder in die Bauchhöhle zurückgeschoben.

Zunächst wird das Peritoneum, dann die Haut zugenäht. Um ein Auskühlen der Maus zu vermeiden wird die Maus mit einer Rotlichtlampe solange bestrahlt, bis sie zu Laufen in der Lage ist.

Nach definierten Zeitpunkten nach der HT wird die Maus getötet und die Leber für weitere Analysen herausgenommen.

#### **4.4.9. Organentnahme**

Um die Leber für weitere Untersuchungen verwenden zu können, wird die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet. Das Öffnen des Bauchraumes geschieht unter möglichst sterilen Bedingungen und die Leber wird an den Ligamenten aus der Maus herausgetrennt.

Die Leber wird für die verschiedenen Untersuchungszwecke unterschiedlich aufbewahrt. Für immunhistologische Färbungen werden einzelne Leberlappen in 7 ml Formaldehyd (3,5%) fixiert, um im Weiteren in Paraffin eingebettet zu werden. Weitere Leberlappen werden für Gewebeschnitte in Kryomolds in Tissue tec eingebettet und auf Trockeneis tiefgefroren. Der Rest der Leber wird in kleine Stückchen geschnitten und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kryogewebe wird bei -80°C gelagert.

### **4.5. Genotypisierung der Versuchstiere**

Für die sichere Bestimmung des Genotyps der Versuchstiere wird eine Genotypisierung der Maus-DNA durchgeführt.

#### **4.5.1. DNA Isolation aus Schwanzbiopsien**

Die DNA wird aus Schwanzbiopsien gewonnen. Im Alter von drei Wochen werden den Mäusen etwa 2 mm der Schwanzspitze abgetrennt. Die Schwanzspitze wird in 477 µl Lyse-Puffer und 23 µl Proteinase K zwei Stunden bei 56 °C inkubiert. Haare und nicht verdaute Bestandteile werden bei 13.000 g abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wird mittels Isopropanol gefällt und anschließend mit 70%-igem Ethanol gewaschen. Getrocknete DNA wird in 300 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

**Lyse-Puffer**

|                             |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| 25 ml                       | 1M Tris HCl pH 8,0 (ad 50mM) |
| 100 ml                      | 0,5M EDTA pH 8,0 (ad 100mM)  |
| 50 ml                       | 1M NaCl (ad 100mM)           |
| 25 ml                       | 20% SDS (ad 1%)              |
| ad 500 ml dH <sub>2</sub> O |                              |

**4.5.2. PCR–Polymerase chain reaction**

Zur Genotypisierung der Versuchstiere wird die aus den Schwanzspitzen extrahierte DNA in einer PCR auf das Vorhandensein verschiedenen Gene geprüft. Mit spezifischen Primern werden spezifische Genabschnitte amplifiziert und auf einem Agarosegel aufgetragen. Es werden folgende Ansätze und Thermocycler-Programme gewählt:

| <b><u>Zielgen</u></b> | <b><u>Primer</u></b> | <b><u>Sequenz in 5'-3'-Orientierung</u></b> |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------------------|
| Cre-Transgen          | cre sense            | CCA CGA CCA AGT GAC AGC AAT                 |
|                       | cre antisense        | TTC GGA TCA TCA GCT ACA CCA                 |
| c-Met                 | c-Met loxP1          | AGC CTA GTG GAA TTC TCT GTA AG              |
|                       | c-Met loxP2          | CCA AGT GTC TGA CGG GTG TG                  |
| NEMO                  | Nemo sense           | TAT GTT TCA CAT CAC ATC GTT ATC C           |
|                       | Nemo antisense       | GCC TTG GTG CTC CCT AAC TC                  |
| Caspase8              | Casp8 WT sense       | CAT ACT GGT TGA GAA CAA GAC CTG G           |
|                       | Casp8 WT antisense   | GCA GAG GTG ACA AGA GGC CAC TG              |
|                       | Casp8 KO sense       | AAC TTC GGC CGG CCA ATA ACT TCG             |
|                       | Casp8 KO antisense   | AGC AGA AAA ACT TGA AGA AAC TTG G           |

Die Primer werden von der Firma MWG synthetisiert.

**Master-Mix Cre PCR**

|       |                  |
|-------|------------------|
| 10 µl | Ready Taq        |
| 1µl   | Primer forward   |
| 1µl   | Primer reverse   |
| 6 µl  | H <sub>2</sub> O |
| 2 µl  | DNA              |

**Cre PCR Programm**

| <b><u>Schritt</u></b>  | <b><u>Temperatur</u></b> | <b><u>Dauer</u></b> | <b><u>Sprung</u></b> | <b><u>Zyklus</u></b> |
|------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C                     | 3 min.              |                      |                      |
| Denaturierung          | 95°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Annealing              | 62°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Elongation             | 72°C                     | 30 sec.             | 2                    | 30                   |
|                        | 4°C                      | ~                   |                      |                      |

**Master-Mix c-Met PCR**

|       |                  |
|-------|------------------|
| 10 µl | Ready Taq        |
| 1µl   | Primer forward   |
| 1µl   | Primer reverse   |
| 6 µl  | H <sub>2</sub> O |
| 2 µl  | DNA              |

**c-Met PCR Programm**

| <b><u>Schritt</u></b>  | <b><u>Temperatur</u></b> | <b><u>Dauer</u></b> | <b><u>Sprung</u></b> | <b><u>Zyklus</u></b> |
|------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Initiale Denaturierung | 95°C                     | 3 min.              |                      |                      |
| Denaturierung          | 95°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Annealing              | 62°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Elongation             | 72°C                     | 30 sec.             | 2                    | 32                   |
|                        | 4°C                      | ~                   |                      |                      |



**Master-Mix NEMO-PCR**

|         |                  |
|---------|------------------|
| 12,5 µl | Hot Star Taq     |
| 1 µl    | Primer forward   |
| 1 µl    | Primer reverse   |
| 9,5 µl  | H <sub>2</sub> O |
| 2 µl    | DNA              |

**NEMO PCR Programm**

| <b><u>Schritt</u></b>  | <b><u>Temperatur</u></b> | <b><u>Dauer</u></b> | <b><u>Sprung</u></b> | <b><u>Zyklus</u></b> |
|------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Initiale Denaturierung | 94°C                     | 3 min.              |                      |                      |
| Denaturierung          | 94°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Annealing              | 60°C                     | 1 min.              |                      |                      |
| Elongation             | 72°C                     | 1 min.              | 2                    | 38                   |
| Finale Elongation      | 72°C                     | 3 min.              |                      |                      |
|                        | 4°C                      | ∞                   |                      |                      |

**Master-Mix Casp8 PCR (WT und KO)**

|       |                  |
|-------|------------------|
| 10 µl | Ready Taq        |
| 1µl   | Primer forward   |
| 1µl   | Primer reverse   |
| 6 µl  | H <sub>2</sub> O |
| 2 µl  | DANN             |

**Caspase8 PCR Programm**

| <b><u>Schritt</u></b>  | <b><u>Temperatur</u></b> | <b><u>Dauer</u></b> | <b><u>Sprung</u></b> | <b><u>Zyklus</u></b> |
|------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Initiale Denaturierung | 98°C                     | 2 min.              |                      |                      |
| Denaturierung          | 95°C                     | 15 sec.             |                      |                      |
| Annealing              | 56°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Elongation             | 72°C                     | 1 min.              | 2                    | 34                   |
| Finale Elongation      | 72°C                     | 5 min.              |                      |                      |
|                        | 4°C                      | ∞                   |                      |                      |

## **4.6. RNA Methoden**

### **4.6.1. RNA Isolation aus Lebergewebe**

Für die Analyse der mRNA Expression bestimmter Gene muss zunächst RNA aus Lebergewebe extrahiert werden. Dazu wird ein ca. 2x2 mm großes Stück kryokonserviertes Lebergewebe auf Trockeneis abgeschnitten und in 1 ml peqGold RNA Pure mittels eines Ultraturrax homogenisiert. Es werden nun 200 µl Chloroform zum Homogenisat dazugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nachdem das Homogenisat 5 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert wurde, wird die obere wässrige Phase abgenommen und zum Fällern der RNA mit 500 µl Isopropanol versetzt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol wird die RNA getrocknet und anschließend in 60 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die RNA wird bei -80°C gelagert.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgt über die Messung der optischen Dichte bei 260 nm. Die RNA wird dazu 1:50 in dH<sub>2</sub>O verdünnt. Als Blankwert wird dH<sub>2</sub>O verwendet. Die RNA Konzentration wird über folgende Formel berechnet:  $1OD_{260}=40 \mu\text{g RNA/ml}$ . Die Reinheit der RNA wurde bestimmt durch  $E_{260}/E_{280}$ . Reine RNA ergibt dabei Werte zwischen 1,8 und 2,0.

### **4.6.2. Reverse Transkription**

Unter der reversen Transkription versteht man die Umschreibung von einzelsträngiger RNA zu komplementärer DNA (cDNA). Anhand der cDNA kann in der Real-time PCR die Expression verschiedener Gene analysiert werden. Zunächst werden von den RNA Proben Konzentrationen von 500 ng/8 µl hergestellt. Vorhandene DNA wird durch Zugabe von 1 µl DNaseI und 1 µl 10x Reaktionspuffer DNaseI und anschließender Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur verdaut. 1 µl 25 mM EDTA stoppt die Reaktion. Es folgt eine Inkubation von 15 Minuten bei 65°C. Für die reverse Transkription wird folgender Ansatz pro Probe verwendet:

| <b><u>Komponente</u></b> | <b><u>Volumen</u></b>             |
|--------------------------|-----------------------------------|
| 10x RT-Puffer            | 2 µl                              |
| dNTP Mix                 | 2 µl                              |
| Oligo-dT Primer          | 2 µl                              |
| RNAse Inhibitor          | 1 µl (Stock: 1:4 in 1x RT Puffer) |
| Omniscript RP            | 1 µl                              |
| H <sub>2</sub> O         | 1µl                               |

Die Komponenten sind im Omniscript RT Kit enthalten.

Die 9 µl aus dem Master Mix werden zur RNA hinzugegeben und die Transkription findet in 60 min bei 37°C statt. Die dann synthetisierte cDNA (20 µl) wird mit 130 µl dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei -20°C gelagert und kann für die quantitative Real-time PCR verwendet werden.

### 4.6.3. Quantitative PCR (Real-time PCR)

Mittels einer quantitativen Real-time PCR ist es möglich definierte DNA-Abschnitte zu amplifizieren und gleichzeitig quantitativ das PCR-Produkt zu analysieren. Durch den fluoreszierenden Farbstoff SYBR GreenEr® lässt sich der Ablauf der PCR in Echtzeit darstellen. SYBR GreenEr® interkaliert in dsDNA wodurch ein Fluoreszenzsignal produziert wird, welches proportional zur vorhanden Menge an dsDNA ist. Die Amplifizierung der DNA sollte unter optimalen Bedingungen logarithmisch ablaufen, was anhand des ansteigenden fluoreszierenden Signals dargestellt werden kann. Für die Generierung von Real-time Daten wird SYBR GreenEr® qPCR SuperMix (Invitrogen) nach Anleitung verwendet. Die Ansätze pro Probe setzen sich wie folgt zusammen:

| <b><u>Komponente</u></b> | <b><u>Volumen</u></b> |
|--------------------------|-----------------------|
| SYBR GreenER®            | 12,5 µl               |
| Primer sense             | 0,5 µl                |
| Primer antisense         | 0,5 µl                |
| H <sub>2</sub> O         | 6,5 µl                |
| cDNA                     | 5 µl                  |

Die Real-time PCR wird in einem 7300 Real-time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Daten werden mit der SDS Software Version V1.3.1 (Applied Biosystems) ausgewertet. Als interner Standard wird die Expression von GAPDH gewählt und bei jeder Reaktion für jede Probe gemessen. Jede Probe wird in Doppelbestimmung gemessen. Für die relative Analyse wird die Zielgen/GAPDH ratio (Ct) mit der Zielgen/GAPDH ratio (Ct<sub>GAPDH</sub>) von Nullkontrollen abgeglichen. Die relative Genexpression wird nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Formel berechnet. Dazu wird  $\Delta\Delta Ct$  nach folgender Formel berechnet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Probe}) - \Delta Ct (\text{Kontrolle})$$

Von diesen Werten werden die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Werte berechnet und als x-fache Induktion der mRNA Expression des entsprechenden Gens im Vergleich zu den Nullkontrollen gewertet.

| <b><u>Zielgen</u></b> | <b><u>Primer</u></b> | <b><u>Sequenz in 5'-3'-Orientierung</u></b> |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------------------|
| HGF                   | HGF-sense            | CCT GTC AGC GTT GGG ATT C                   |
|                       | HGF-antisense        | CTC GGA TGT TTG GGT CAG TGG                 |

| <b><u>Schritt</u></b>    | <b><u>Temperatur</u></b> | <b><u>Dauer</u></b> | <b><u>Sprung</u></b> | <b><u>Zyklus</u></b> |
|--------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Initiierung              | 56°C                     | 2 min.              |                      |                      |
| Aktivierung              | 95°C                     | 10 min.             |                      |                      |
| Denaturierung            | 95°C                     | 15 sec.             |                      |                      |
| Annealing/Amplifizierung | 58-60°C                  | 1 min.              | 2                    | 40                   |
| Denaturierung            | 95°C                     | 15 sec.             | } Schmelzkurve       |                      |
| Annealing                | 60°C                     | 30 sec.             |                      |                      |
| Denaturierung            | 95°C                     | 15 sec.             |                      |                      |

#### **4.7. Immunhistochemie**

Immunhistologische Untersuchungen sowie die Färbung von Kollagen mit Sirius Rot werden auf entparaffinisierten Gewebeschnitten durchgeführt. Das in Formaldehyd (3,5%) fixierte Gewebe wird dazu vorher dehydriert und dann in Paraffin eingebettet. Die am Mikrotom hergestellten Schnitte werden vor Beginn der jeweiligen Färbung über Nacht bei 37°C gebacken um die Schnitte zu fixieren.

##### **4.7.1. H&E Färbung**

Die Hämatoxylin/Eosin Färbung (H&E) dient vor allem der Übersicht über einen Gewebeschnitt und lässt verschiedene Krankheitsbilder an der Gewebestruktur erkennen. Zur Entparaffinisierung werden die 2 µm dicken Schnitte zunächst 10 Minuten in Xylol inkubiert und anschließend einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%, H<sub>2</sub>O) ausgesetzt. In Hämalun werden die basophilen Strukturen, also die Zellkerne, angefärbt und anschließend unter warmem fließendem Wasser sichtbar gemacht (bläuen). Die folgende Behandlung in Eosin färbt das Zytoplasma. Eine aufsteigende Alkoholreihe und am Ende Xylol beenden die Färbung. Eingedeckelt wird mit Vitroclud.

##### **4.7.2. Kollagenfärbung mit Sirius Rot**

Mittels Sirius Rot werden kollagenhaltige Strukturen auf Paraffinschnitten angefärbt. Das Gewebe wird in 5 µm dicke Schnitte geschnitten und über Nacht bei 37°C gebacken. Eine Xylolbehandlung sowie eine Behandlung in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffinisiert den Gewebsschnitt. Dann werden die Schnitte 1 Stunde in 0,1%-iger Sirius-Rot Lösung inkubiert. Die Färbung wird mit 0,01 M HCl in 2 Minuten abgestoppt. Nachdem die Schnitte in H<sub>2</sub>O gespült werden, folgt eine aufsteigende Alkoholreihe und anschließend eine Xylol-Behandlung. Mit Vitroclud wird eingedeckelt.

##### **Sirius Rot Lösung**

0,2g Sirius-Rot auf 200ml Pikrinsäure

pH2

Die Schnitte werden im Mikroskop unter polarisierendem Licht fotografiert.

#### **4.8. Immunfluoreszenzfärbung**

Um verschiedene Strukturen bzw. bestimmte Epitope auf Zelloberflächen anzufärben und kenntlich zu machen bietet sich die Immunfluoreszenzfärbung an. Aus Gewebe werden 5 µm dicke Kryoschnitte vorbereitet, die bei -20°C für 2 Wochen gelagert werden können. Allen Immunfluoreszenzfärbungen ist gemein, dass die Schnitte zunächst 2 Stunden bei Raumtemperatur trocknen müssen. Die Fixierung erfolgt über eiskalten Aceton oder 4%-iges PFA. Um ein Ablaufen der Antikörper vom Objektträger zu verhindern, werden die Schnitte mit einem Fettstift umrandet und unabhängig der Temperatur, stets in einer feuchten Kammer, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, inkubiert. Waschschritte dauern, soweit nicht anders angegeben, 3 x 10 Minuten in PBS oder TBS-T. Unspezifische Bindungsstellen werden über einen separaten Blocking-Schritt mit BSA, Ziegen- oder Maus-Serum oder durch Zugabe dieser Reagenzien zu den Antikörperverdünnungen geblockt. Der Erstantikörper bindet spezifisch an das gewünschte Epitop, während der Zweitantikörper spezifisch an den Erstantikörper bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

Fotografiert werden die Schnitte mit Axiovision Imager Z1 (Zeiss). Die Bearbeitung und Auswertung erfolgt mit der Software Axiovision 4.4 (Zeiss). (Siehe Kapitel 4.12.1).

##### **4.8.1. Humanes alpha 1-Antitrypsin (hAAT) Färbung**

Der Nachweis des Markerproteins hAAT, das von transplantierten Spenderzellen und daraus entstandenen Zellen exprimiert wird, wird auf Gewebeschnitten nach einem Standard-Protokoll durchgeführt und kann mit verschiedensten weiteren Färbungen kombiniert werden.

- Aceton, 10 Minuten auf Eis
- Rehydrieren in PBS, 5 Minuten
- Waschen in H<sub>2</sub>O, 2 Minuten
- Waschen in TBS-T
- 1. Antikörper: Anti-α1-anti Trypsin (Fitzgerald), 1:200 in TBS-T mit 0,2 % BSA, 1h bei RT
- Waschen in TBS-T

- 2. Antikörper: Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit, 1:200 in TBS-T mit 0,2 % BSA, 1h bei RT, abgedunkelt
- Abgedunkelt waschen in TBS-T
- Eindeckeln mit Vectashield mounting medium mit Dapi
- Lagerung etwa 2 Wochen bei 4°C

### 4.8.2. BrdU-hAAT Doppelfärbung

Die Analyse proliferierender Zellen und deren Lokalisation erfolgt über eine Doppelfärbung von BrdU und hAAT. Dazu wird den Mäusen zwei Stunden vor Organentnahme 200 µg 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) intraperitoneal injiziert. BrdU inkorporiert in sich gerade in der S-Phase der Mitose befindlichen Zellkerne.

- Aceton; 10 Minuten auf Eis
- Lufttrocknen; 7 Minuten
- Rehydrieren in PBS; 5 Minuten
- 2N HCl, 30 Minuten
- Neutralisieren mit Natrium-Borat pH8; 9 Minuten
- Waschen in H<sub>2</sub>O; 5 mal
- Waschen in PBS
- Blocken: 10 % goat-serum und 0,2 % BSA; 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Waschen; 3x 10 Minuten in PBS
- 1. Antikörper: BrdU 1:40; hAAT 1:200; in 0,2 % BSA; 1 Stunde bei 37°C
- Waschen in PBS
- 2. Antikörper: Alexa Fluor 488 anti mouse 1:200; Alexa Fluor 594 anti rabbit 1:200; 1 Stunde abgedunkelt inkubieren
- Abgedunkelt waschen in PBS
- Eindeckeln

### 4.8.3. Ki-67- $\beta$ -Catenin Doppelfärbung

Eine weitere Methode proliferierende Zellen zu kennzeichnen ist die Ki67 (Kiel 1967) Färbung. Im Unterschied zur BrdU-Färbung bindet der Antikörper nicht nur an Zellen, welche sich in der S-Phase der Mitose befinden, sondern an sämtliche sich in der Interphase befindenden proliferierenden Zellen.

- Fixierung, 4% PFA; 15 min bei RT
- Waschen in PBS
- Blocken: 0,3% TritonX-100, 5% Ziegenerum in PBS; 1 Stunde
- 1.Antikörper: Ki67 1:100,  $\beta$ -Catenin 1:1000 in 0,3% TritonX-100, 5% Ziegenerum in PBS; über Nacht
- Waschen in PBS
- 2.Antikörper: Alexa Fluor 594 1:200; Alexa Fluor 488 1:200 in PBS; 1 Stunde
- Abgedunkelt waschen in PBS
- Eindeckeln

### 4.8.4. TUNEL Färbung

Die TUNEL Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) dient der Darstellung apoptotischer Zellen. Die Färbung wird mit dem TUNEL Kit von Roche durchgeführt.

- Fixierung, 4 % PFA; 20 min bei RT
- Waschen in PBS
- Permeabilisieren in Permeabilisierungslösung; 2 min bei RT
- Waschen in PBS; 2x 10 min bei RT
- TUNEL Label Mix; 50  $\mu$ l pro Schnitt; über Nacht bei 4°C
- Abgedunkelt waschen in PBS
- Eindeckeln mit Vectashield mounting medium mit Dapi
- Lagerung nur 2 Tage bei 4°C



### **Permeabilisierungs-Lösung**

|              |       |
|--------------|-------|
| Triton-X 100 | 0,1 % |
| Na-Citrat    | 0,1 % |
| In PBS       |       |

### **TUNEL Label Mix**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Enzyme Lösung        | 1 µl  |
| TUNEL Diluent Puffer | 9 µl  |
| TUNEL Label Solution | 90 µl |

### **4.8.5. CD4 Färbung**

Zur Analyse von Entzündungsprozessen eignet sich eine Färbung von CD4 positiven Zellen. Die Auswertung erfolgt über die Quantifizierung der positiven Zellen.

- Fixierung in 95% Ethanol bei Raumtemperatur; 30 min
- Waschen in PBS
- Blocken mit 20% Ziegen- oder Mausserum in PBS; 30 min bei RT
- Antikörper; direkt gelabelter Antikörper CD4 Alexa Fluor 488 1:100 in PBS mit 1,5% Ziegenserum bei 4°C; über Nacht
- Abgedunkelt waschen in PBS; 5 min
- Eindeckeln

### **4.8.6. CD11b Färbung**

Mit Hilfe des Oberflächenmarkers CD11b lassen werden Neutrophile angefärbt. Die Auswertung erfolgt durch Quantifizierung der CD11b-positiven Zellsignale.

- Fixierung mit 4%-igem PFA, 10 Minuten
- Waschen in PBS/azid, 3x 3 Minuten
- Blocken mit 0,2% BSA in PBS/azid; 5 Minuten
- 1. Antikörper; CD11b 1:100 in PBS/azid mit 1% Mausserum; 45 Minuten
- Waschen in PBS/azid; 2x 3 Minuten
- Blocken mit 0,2% BSA in PBS/azid; 5 Minuten
- 2. Antikörper; Cy3 anti rat 1:300 in PBS/azid mit 1% Mausserum
- Waschen in PBS/azid; 2x 3 Minuten
- Eindeckeln

#### **4.8.7. F4/80 – hAAT Doppelfärbung**

Makrophagen können mit der F4/80 Färbung dargestellt werden. Um die Zellen bezüglich der transplantierten Spenderzellen zu lokalisieren, wird eine F4/80-hAAT Doppel-Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

- Fixierung; Aceton; 10 Minuten auf Eis
- Trocknen; 7 Minuten
- Waschen in PBS/azid; 3x 3 Minuten
- Blocken; 0,2 % BSA/PBSazid für 5 Minuten
- 1. Antikörper; F4/80 1:100; hAAT 1:200; in PBSazid mit 1% Mausserum
- Waschen in PBSazid; 3x 3 Minuten
- Blocken; 0,2 % BSA/PBSazid für 5 Minuten
- 2. Antikörper; Alex Fluor 488 donkey anti rat 1:300; Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit 1: 200; in PBSazid mit 1 % Mausserum
- Waschen in PBSazid; 3x 3 Minuten
- Eindeckeln

#### **4.8.8. Collagen – hAAT Doppelfärbung**

Erhöhte Collageneinlagerungen in das Gewebe sind ein Zeichen für strukturelle Umbaumaßnahmen in der Leber. Zur Lokalisation dieser Umbauzeichen in Spenderzellgewebe oder Empfängerorgane, wird eine Doppelfärbung von Collagen und hAAT durchgeführt.

- Fixierung in Aceton; 10 Minuten auf Eis
- Trocknen; 7 Minuten
- Rehydrieren in PBS; 5 Minuten
- Blocken in 5 % goat Serum und 0,3 % Triton-X in PBS; 30 Minuten
- 1. Antikörper; Collagen 1:250 in 5 % goat Serum und 0,3 % Triton-X in PBS; 90 Minuten bei Raumtemperatur
- Waschen in PBS
- 2. Antikörper; Alexa Fluor 488 anti rabbit 1:200 in PBS
- Waschen in PBS

- 1. Antikörper; Anti- $\alpha$ 1-anti Trypsin 1:200 in PBS mit 0,2 % BSA; 1 Stunde bei Raumtemperatur
- Waschen in PBS
- 2. Antikörper; Alexa Fluor 594 donkey anti rabbit 1:200 in 0,2 % BSA/PBS; 1 Stunde
- Waschen in PBS
- Eindeckeln

### **4.8.9. $\alpha$ -SMA – Färbung**

Aktivierten Sternzellen verlieren durch ihre Aktivierung ihre Funktion als Vitamin A Speicher und beginnen mit der Synthese von extrazelluläre Matrix sowie Collagen. Mit Hilfe der  $\alpha$ -SMA Färbung lassen sich diese Strukturen immunfluoreszent anfärben.

Fixierung für 10 Minuten in eiskaltem Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ )

- Waschen in TBS-T
- Permeabilisieren in 0,1% Triton in 0,1% NaCitrat/TBS-T für 2 Minuten
- Waschen in TBS-T
- Blocken in 3% BSA/TBS-T bei RT
- Waschen in TBS-T
- Antikörper:  $\alpha$ -SMA in 05% BSA/TBS-T bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1 Stunde
- Waschen in TBS-T
- 2. Antikörper: Alexa Fluor 488 goat anti mouse 1:500 in 0,5% BSA/TBS-T für 1 Stunde bei RT
- Abgedunkelt waschen in TBS-T
- Eindeckeln

#### 4.9. *ELISA-Serum Enzyme-linked Immunosorbend Assay*

Der Nachweis des Markerproteins hAAT, welches von transplantierten Zellen exprimiert wird, geschieht mittels eines ELISAs. Dazu werden den Mäusen zunächst etwa 10 Tropfen Blut retro-orbital entnommen und bei 10.000 g 10 Minuten zentrifugiert. Das Serum im Überstand kann bei -20°C gelagert werden. Für den Nachweis von hAAT in diesem Serum werden zunächst ELISA Module (Nunc F16 maxisorp immuno module, Nunc) beschichtet. In diesem Schritt binden 50 µl des primären Antikörper (anti-human- $\alpha$ -1-Antitrypsin, Sigma) in einer Verdünnung von 1:1000 in coating-Puffer 1 Stunde bei 37°C an den Boden der wells. Anschließend werden die wells mit 180 µl TBS-T 4 Mal gewaschen. Durch eine einstündige Inkubation von 100 µl 5%-iger Magermilch in TBS-T bei Raumtemperatur werden unspezifische Bindungsstellen geblockt. Im Anschluss wird die Serumprobe in unterschiedlichen Verdünnungen (1:100 bis 1:10.000.000) in 5%-iger Magermilch für 2 Stunden bei Raumtemperatur in die wells gegeben. Nachdem die wells erneut gewaschen werden, gibt man 50 µl des zweiten Antikörpers pro well an das Antigen. Die Inkubation beträgt für diesen Schritt eine Stunde bei Raumtemperatur. Für die Entwicklung des ELISAs werden die wells 6-mal mit 180 µl TBS-T gewaschen. Eine TMB-Tablette wird in 10 ml Citrat-Phosphatpuffer gelöst und mit 3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert. 50 µl dieser Entwicklerlösung werden in jedes well gegeben. Proben mit hoher hAAT-Konzentration verfärben sich blau. Um die Reaktion nach etwa 2 Minuten abzustoppen werden pro Probe 50 µl 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzugegeben. Die Proben verfärben sich jetzt gelb. Die Absorption wird bei 450 nm gemessen. Als Standard wird der Calibrator 4 von 100 µg bis 1,56 µg verwendet. Die Auswertung erfolgt anhand der Standardkurve. Es werden nur Werte verwendet deren Extinktionswerte im exponentiellen Anstieg der Standardkurve liegen. Deshalb werden die Proben in Verdünnungen von 1:100 bis 1:1.000.000 gemessen.

Als Basiswert für den Anstieg des hAAT-Levels im Serum wird der hAAT-Wert ein Tag nach HT gewählt und als 1 definiert.

| <u>Coating-Puffer</u>           |       | <u>Citrat-Phosphat-Puffer</u> |       | <u>TBS-T</u>                |       |
|---------------------------------|-------|-------------------------------|-------|-----------------------------|-------|
| NaHCO <sub>3</sub>              | 0,1 M | Na-Citrat                     | 0,1 M | 1 M Tris pH7,5              | 50ml  |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 0,1 M | pH 4,5                        |       | NaCl                        | 5,84g |
| pH 9,5                          |       |                               |       | Tween20                     | 0,5ml |
|                                 |       |                               |       | ad 1 Liter H <sub>2</sub> O |       |

## **4.10. Proteinbiochemische Methoden**

### **4.10.1. Proteinisolierung aus Lebergewebe**

Etwa 2mm<sup>3</sup> tiefgefrorenes Lebergewebe wird in Proteinextraktions-Puffer mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert. Das Homogenat wird für 10 Minuten bei 12000 g bei 4°C zentrifugiert. Die Konzentration der Proteine, welche sich im Überstand befinden wird per Bradford assay bestimmt. Die Proteine können bei -80°C gelagert werden.

#### **Proteinextraktions-Puffer**

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| NaCl 3 M                             | 2,5 ml |
| EGTA 0,01 M                          | 5 ml   |
| EDTA pH8 0,5 M                       | 100 µl |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M | 500 µl |
| Tris pH 7,5 1 M                      | 1 ml   |
| NaF 1 M                              | 100 µl |
| TritonX-100                          | 500 µl |
| PMSF 0,1 M(in ETOH)                  | 500 µl |
| Proteinase Inhibitor Tablette        | 1      |
| Orthovanadat 1 M                     | 50 µl  |
| ad 10,25 ml                          |        |

### **4.10.2. Bradford assay**

Mit der Bradford Methode lässt sich der Proteingehalt in Proben bestimmen. Die Methode basiert auf der Bindung von Commassie brilliant Blau an Proteinkomplexe und der darauf folgenden Verschiebung des Absorptionsspektrums (Bradford 1976). Die Messung erfolgte mit BioRad Reagenzien nach Vorgabe. Die Standardkurve wurde mit BSA hergestellt. Zu 798µl der 1:5 verdünnten Färbelösung werden 2 µl der isolierten Proteine gegeben, gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wird bei 595 nm gemessen. Die gemessenen Proteinwerte werden mit der Standardkurve aus BSA berechnet.

#### 4.10.3. Western Blot

Die aus Lebergewebe gewonnenen Proteine werden zur Probenvorbereitung mit einem Überschuss an SDS versetzt und für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend werden 50 µg jeder Probe auf das Sodium dodecyl sulphate (SDS) Gel aufgetragen nach der bewährten Methode nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Auftrennung der Proteine per Elektrophorese erfolgt bei 25 mA für eine Stunde. Danach werden die Proteine mittels Wet-Blot für 90 Minuten auf eine Polyvinyl-fluorid Membran transferiert. Der Proteintransfer wird mittels einer Ponceau-Färbung getestet. Dazu wird die Membran 1 Minute in Ponceau-Rot Färbung geschwenkt, der Proteintransfer begutachtet und anschließend unter fließendem Wasser wieder entfärbt. Zum Blocken unspezifischer Bindungen wird die Membran für eine Stunde in 5% Magermilchpulver in TBS-T geschwenkt. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgt in TBS-T über Nacht bei 4°C. Die Membran wird 2 Mal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen und anschließend für 1 Stunde im 2. Antikörper in TBS-T inkubiert. Vor der Proteindetektion wird die Membran erneut 2 Mal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Darauf folgt die Inkubation mit ECL (enzymatische Chemilumineszenz) für 2 Minuten. Die Entwicklung erfolgte auf Röntgenfilmen.

##### Transferpuffer

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| 10x Stock               | 100 ml |
| Methanol                | 200 ml |
| ad 1L dH <sub>2</sub> O |        |

##### Transferpuffer (Stocklösung)

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| Tris                    | 24,4 g  |
| Glycin                  | 112,6 g |
| ad 1L dH <sub>2</sub> O |         |

##### Sammelgel

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| Puffer A                   | 7.5 ml |
| Acrylamid                  | 4.5 ml |
| APS (10 %)                 | 225 µl |
| TEMED                      | 15 µl  |
| ad 18 ml dH <sub>2</sub> O |        |

##### Trenngel (10%)

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| Puffer B                     | 14,8 ml |
| Acrylamid                    | 16,7 ml |
| APS (10%)                    | 300 µl  |
| TEMED                        | 30 µl   |
| ad 18,5 ml dH <sub>2</sub> O |         |

##### Puffer A

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| Tris HCL                           | 46 g |
| SDS                                | 2g   |
| pH 6,8 ad 100 ml dH <sub>2</sub> O |      |

##### Puffer B

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| Tris HCL                           | 16,5 |
| SDS                                | 2g   |
| pH 8,8 ad 100 ml dH <sub>2</sub> O |      |

## **4.11. Zellkulturarbeiten**

### **4.11.1. Allgemeine Zellkulturarbeiten**

Arbeiten sowohl mit primären Zellen als auch mit Zellkulturen werden unter einer Sterilbank durchgeführt. HEK293 Zellen, die in späteren Schritten mit Adenoviren infiziert werden sollten, wurden unter S1-Bedingungen in einem Inkubator mit 5Vol% CO<sub>2</sub>-Anteil bei einer Temperatur von 37°C gezüchtet, und erst zur eigentlichen Arbeit mit Adenoviren in ein S2-Labor gebracht. Das verwendete Zellkulturmedium besteht aus DMEM-high-Glucose Medium (Gibco) mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin. Die Zellen werden auf 10 cm Zellkulturplatten gezüchtet und vermehrt. Die Vermehrung der Zellen erfolgt durch Splitten der vorhandenen Zellen. Dazu werden die Zellen in der Petrischale unter dem Mikroskop betrachtet und abgeschätzt in welchem Verhältnis sich die Zellen am effektivsten splitten lassen. Üblicherweise wurde im Verhältnis 1:5 gesplittet. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit etwa 10 ml PBS gewaschen. Dann wird 1 ml Trypsin auf die Zellen gegeben und diese etwa eine Minute bei 37°C inkubiert. Dadurch lösen sich die Zellen vom Schalenboden ab. Dazu gibt man 4 ml supplementiertes Medium, homogenisiert die Zellen durch auf- und abpipettieren und gibt davon je 1 ml in eine neue Zellkulturschale, in die bereits 9 ml Medium vorgelegt wurde. Durch vorsichtiges auf- und abschwenken verteilen sich die Zellen gleichmäßig in der Schale. Meist sind die Zellen nach 48 Stunden bis zu 100%iger Konfluenz gewachsen, so dass erneut gesplittet werden kann.

### **4.11.2. S2 Zellkulturarbeiten mit Adenoviren**

Für die Arbeit mit Adenoviren werden die Zellkulturschalen in einen eigens für S2-Arbeiten eingerichteten Raum transferiert und hier in einem Inkubator gehalten. Für die Präparation der Adenoviren wurden HEK293 Zellen verwendet. Dreißig 10cm Platten wurden bis zu 100% iger Konfluenz wachsen gelassen und dann infiziert. Die Infektion erfolgt durch Zugabe von 10 µl Virusstock pro Schale. Der Virusstock mit dem NK4-überexprimierenden Adenovirus wurde uns von Danielle Heideman (University Medical Center, Amsterdam, Niederlande) zur Verfügung gestellt. Der Virusstock wird dazu vorher mit 2% FCS Mangelmedium auf ein Volumen von 10ml gebracht und, die dann pro Schale dazugegeben werden. Die Zellen werden bei 37°C im Brutschrank solange inkubiert bis der zytopathische

Effekt unter dem Mikroskop sichtbar wird. In der Regel dauert das etwa 24 Stunden. Dann werden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren des Mediums in der Zellkulturschale vorsichtig abgelöst und in 50 ml Gefäße überführt. Die Zellen werden bei 200 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Pellets in 2 ml PBS aufgenommen und vereinigt. Das Aufschließen der Zellen erfolgt über eine dreimalige Wiederholung von schnellem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C im Wasserbad. Anschließend werden die aufgeschlossenen Zellen bei 200 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand gesammelt, das Pellet erneut in 2 ml PBS aufgenommen und der Überstand mit dem vorherigen Überstand vereinigt. Um das im Überstand enthaltene Virus aufzureinigen werden 4 ml des Überstandes auf einen Cäsium-Chlorid Gradienten (3,5 ml Cäsiumchlorid 1,2 über 3,5 ml Cäsiumchlorid 1,4) geladen. Durch Ultrazentrifugation bei 4°C und 27500 g wird das Virus aufgereinigt. Dabei entstehen zwei sichtbare Banden von denen die untere und dickere das Virus enthält und durch einstechen des Röhrchens mit einer Spritze abgezogen wird. Die Viruslösung wird mit 1 Vol 2x Lagerungspuffer versetzt und kann so bei -20°C gelagert werden.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt über die Messung der Optischen Dichte (OD) bei 260 nm. Eine OD von 1,0 entspricht dabei  $10^{12}$  viralen Partikeln/ml. Bei einem Titer von  $4 \times 10^{12}$  benötigt man 50 µl für eine 80%ige Transduktion der Leber. Vor der Injektion in die Mäuse wird durch Dialyse ein Austausch des Lagerungspuffers des Virus gegen ein physiologisches Medium durchgeführt. Das Virus wird dazu in einen beidseitig verschließbaren Dialyseschlauch gefüllt und über Nacht gegen Dialysepuffer dialysiert.

Die Injektion erfolgt über die Schwanzvene.



### **CsCl<sub>2</sub>-Gradient**

|                        |                            |                        |                           |
|------------------------|----------------------------|------------------------|---------------------------|
| <b>Dichte 1,2g/ml:</b> | 13,25 g CsCl <sub>2</sub>  | <b>Dichte 1,4g/ml:</b> | 26,75 g CsCl <sub>2</sub> |
|                        | 0,5 ml 1M Tris pH7,5       |                        | 0,5 ml Tris pH7,5         |
|                        | ad 50 ml dH <sub>2</sub> O |                        | ad 50ml dH <sub>2</sub> O |

### **2x Lagerungspuffer**

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| 1M Tris pH8,0           | 100 µl  |
| 5M NaCl                 | 200 µl  |
| 1M MgCl <sub>2</sub>    | 10 µl   |
| Glycerol                | 5 ml    |
| H <sub>2</sub> O        | 4,69 ml |
| Frisch zusetzen 10% BSA | 100 µl  |
| Sterilfiltrieren        |         |

### **Dialysepuffer**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| 1M Tris pH8,0        | 20 ml |
| 1M MgCl <sub>2</sub> | 2ml   |
| 5M NaCl              | 56 ml |

## **4.12. Analysen**

### **4.12.1. Auswertungen von Immunfluoreszenzgefärbten Kryoschnitten**

Sämtliche Fluoreszenzfärbungen wurden am Mikroskop (Iamger Z.1) der Firma Zeiss mikroskopiert und mit der Software AxioVision als Bild aufgenommen. Wurden bestimmte Zelltypen angefärbt, erfolgte die Auswertung durch Auszählen der positiven Zellen (BrdU-, TUNEL-, Ly6G-, F4/80-, CD11b-, CD4-Färbungen). Die Anfärbung von fibrillären Strukturen ( $\alpha$ -Sma, Collagen) wurde bei den verschiedenen Proben unter gleicher Belichtungszeit am Mikroskop aufgenommen. Die Auswertung erfolgte densitometrisch mit der Software ImageJ 37.1c. Dabei wurde ein farbbasierter Schwellenwert für das positive Signal festgelegt und das Programm berechnet die Prozentzahl des für dieses Gesichtsfeld positiven Signals.

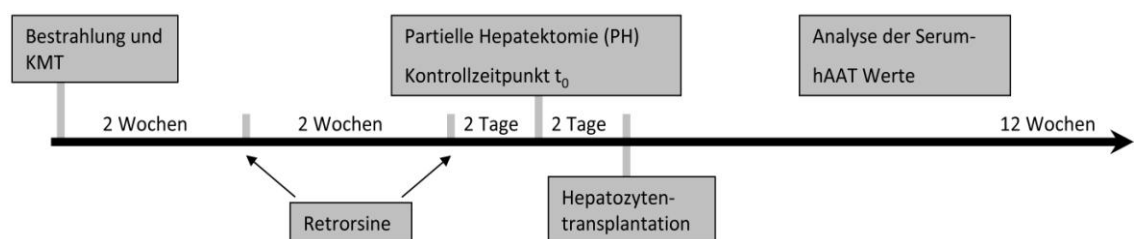
### **4.12.2. Statistische Analysen**

Die Werte werden mit der durchschnittlichen Standardabweichung präsentiert, welche mit MS Excel (2007) berechnet wurde. Signifikanzen wurden mittels des T-Tests zweiseitig und unpaarig berechnet. Daraus berechnete Werte, die kleiner als 0,05 waren wurden als signifikant bezeichnet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. *Transplantation und Integration adulter Hepatozyten in der Leber*

Zur erfolgreichen Durchführung von Hepatozytentransplantations-Experimenten muss zunächst ein etabliertes Operations- und Behandlungsprotokoll zur Verfügung stehen. Die Transplantation adulter Hepatozyten in unbehandelte gesunde Empfänger führt in der Regel nicht zu einer konstanten Ansiedlung und Integration dieser in das Empfänger-Lebergewebe. Vielmehr müssen Bedingungen geschaffen werden, die den transplantierten Spenderhepatozyten einen Selektionsvorteil bieten. Dazu wurden die Empfängertiere einem bereits etablierten Konditionierungsprozedere unterzogen. Dieses besteht aus Gammabestrahlung (12Gy) mit anschließender Knochenmarkstransplantation, der zweimaligen Injektion von Retrorsine sowie einer 2/3 Hepatektomie (PH) der Leber. Die Bestrahlung sowie die Gabe von Retrorsine führen zu einer Inhibierung der Proliferation residenter Leberzellen. Durch die darauffolgende PH wird in der Leber ein Proliferationsstimulus ausgelöst. Die Transplantation von  $1 \times 10^6$  Spenderhepatozyten über die Milz erfolgte 48 Stunden nach PH. Als Spendermäuse wurden Mäuse verwendet, die transgen sind für das humane alpha 1-Antitrypsin (hAAT), welches unter einem alpha 1-Antitrypsin Promoter - und somit ausschließlich in den Hepatozyten - exprimiert wird. Der durch die PH gesetzte Proliferationsreiz kann von diesen transplantierten Spenderzellen ausgenutzt werden.

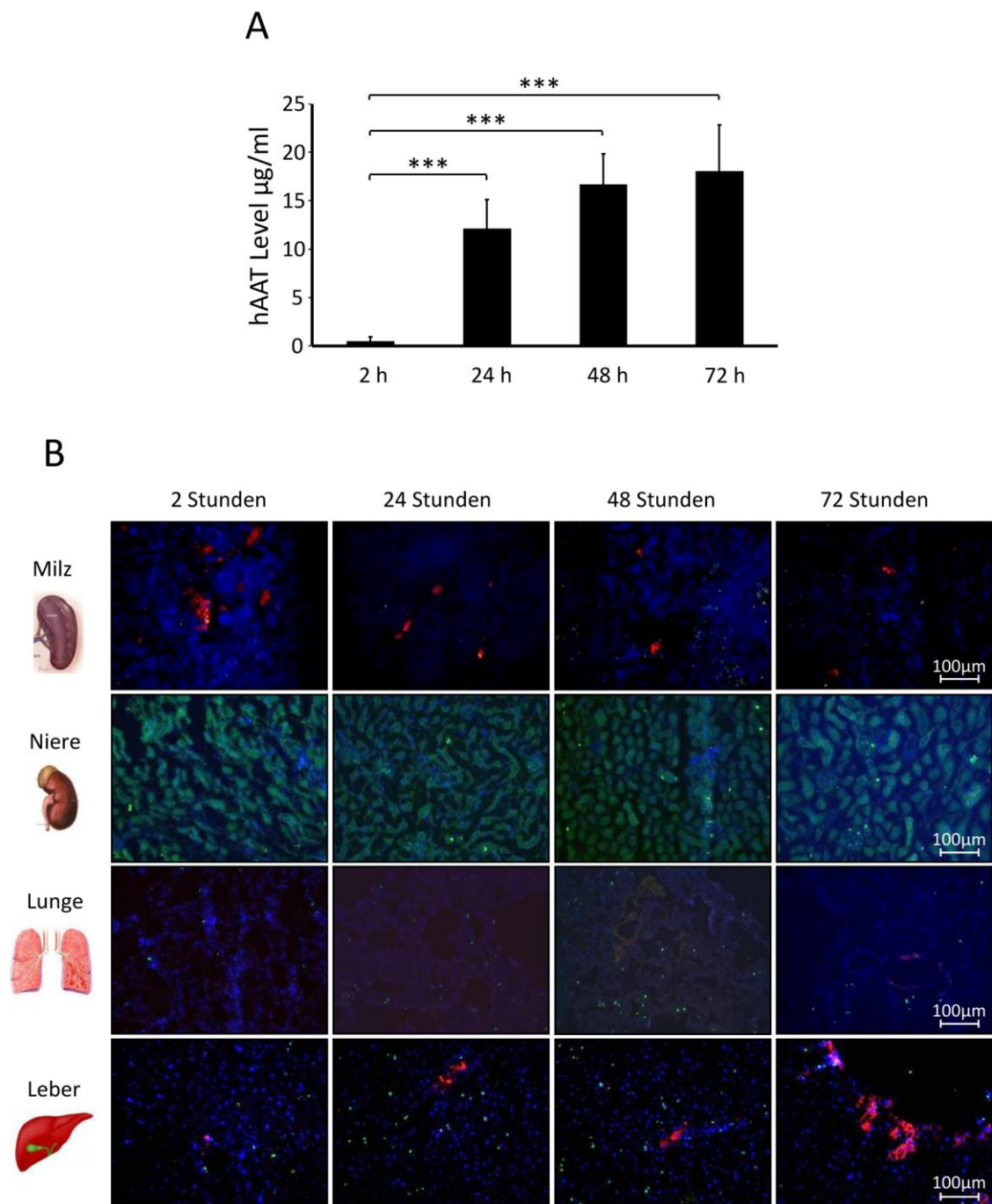


**Abbildung 5.1: Experimentelles Design.**

Die Vorbereitung der Empfängermäuse beginnt vier Wochen vor der eigentlichen Transplantation mit einer Ganzkörperbestrahlung mit 12 Gy sowie einer anschließenden Knochenmarkstransplantation. Im Abstand von 2 Wochen wird den Mäusen zweimalig der Proliferationshemmer Retrorsine i.p. verabreicht. Die Resektion von 70% der Leber setzt einen Proliferationsstimulus frei, der 48 Stunden später durch transplantierte Spenderhepatozyten ausgenutzt werden kann.

Es wurde zunächst untersucht, in welchen Organen sich die transplantierten Hepatozyten wenige Stunden nach der Transplantation über die Milz befinden, und wo sie sich eventuell schon beginnen anzusiedeln, ein Effekt, der auch als *homing* bezeichnet wird. Als Empfängertiere wurden Wildtyp (WT) Tiere verwendet. Die Spendertiere sind transgen für das Markerprotein hAAT. Für die Untersuchungen wurden 2, 24, 48 und 72 Stunden nach der Hepatozyten-Transplantation (HT) Blut, Leber, Milz, Lunge und Niere entnommen und immunhistochemisch (hAAT-Immunfluoreszenz-Färbung), bzw. immunologisch (ELISA) auf das Markerprotein hAAT hin untersucht.

Die Ausbreitung der Spenderhepatozyten wurde anhand des Gehaltes des sezernierten Markerproteins hAAT im Blut mittels ELISA gemessen. Die Messung des Serum-hAAT Gehaltes ergibt signifikant steigende Konzentrationen des Spenderzellmarkers mit fortschreitender Zeit nach HT (Abb. 5.2A). Ein erhöhter Serum-hAAT Wert korreliert mit der Anzahl an Zellen, welche von Spenderzellen abstammen. Die Lokalisation der hAAT-exprimierenden Zellen erfolgte auf Gefrierschnitten durch immunhistochemische Fluoreszenzfärbung des Markerproteins hAAT in allen vier entnommenen Geweben und zu jedem der vier Zeitpunkte. Diese zeigte, dass in der Milz 2 Stunden nach HT hAAT(+) Zellen nachgewiesen werden können. Mit größerem zeitlichen Abstand zur HT verringerte sich die Zahl an hAAT(+) Hepatozyten in der Milz jedoch rasch. Lunge und Niere konnten zu keinem der untersuchten Zeitpunkte hAAT-positive Zellen aufweisen. In der Leber ließ sich mit steigendem zeitlichem Abstand nach HT eine erhöhte Zahl an hAAT-exprimierenden Zellen erkennen (Abb. 5.2B).



**Abbildung 5.2: Repopulation der Leber nach Hepatozytentransplantation.**

Wildtyp Empfängermause wurden mittels Bestrahlung, anschließender KMT, sowie durch die Behandlung mit Retrorsine und der Durchführung einer 2/3 PH konditioniert. **A:** Nachweis des Spenderzellmarkers hAAT im peripheren Blut mittels ELISA. **B:** Immunfluoreszenz-Färbung des Spenderhepatozytenmarkers hAAT in Milz, Niere, Lunge und Leber (rot: hAAT(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit DAPI).

## **5.2. Analyse der Rolle von c-Met bei der Ansiedlung und Proliferation transplanteder Hepatozyten**

Ziel dieser Untersuchung ist es Mechanismen, welche der Leberrepopulation im Rahmen von Hepatozytentransplantationen zugrunde liegen, näher zu charakterisieren. Dabei soll vor allem die c-Met-abhängige *in vivo* Repopulation der Spenderzellen Gegenstand der Untersuchungen sein.

c-Met defiziente (c-Met<sup>Δhepa</sup>) und WT (c-Met<sup>loxP/loxP</sup>) Empfängermause wurden vor der Hepatozytentransplantation konditioniert. Die Konditionierung bestand aus einer initialen Leberschädigung durch Bestrahlung (12 Gy) und anschließender Knochenmarks-Transplantation (KMT). Die zweimalige Behandlung mit Retrorsine und die Durchführung einer PH führen zu gehemmter Proliferation residenter Zellen sowie der Induktion eines Proliferationsstimulus für transplantierte Zellen. Die intrasplenische Hepatozytentransplantation erfolgte 48 Stunden nach PH. Die Messung der Ansiedlung transplanteder Hepatozyten anhand des Serum-hAAT Wertes wurde mittels ELISA durchgeführt. Das Expressionsniveau des Markerproteins hAAT im Blut 24 Stunden nach HT wurde als Basiswert (1) definiert. Die hAAT-Expressionswerte weiterer Zeitpunkte wurden individuell auf den Basiswert pro Versuchsgruppe normiert.

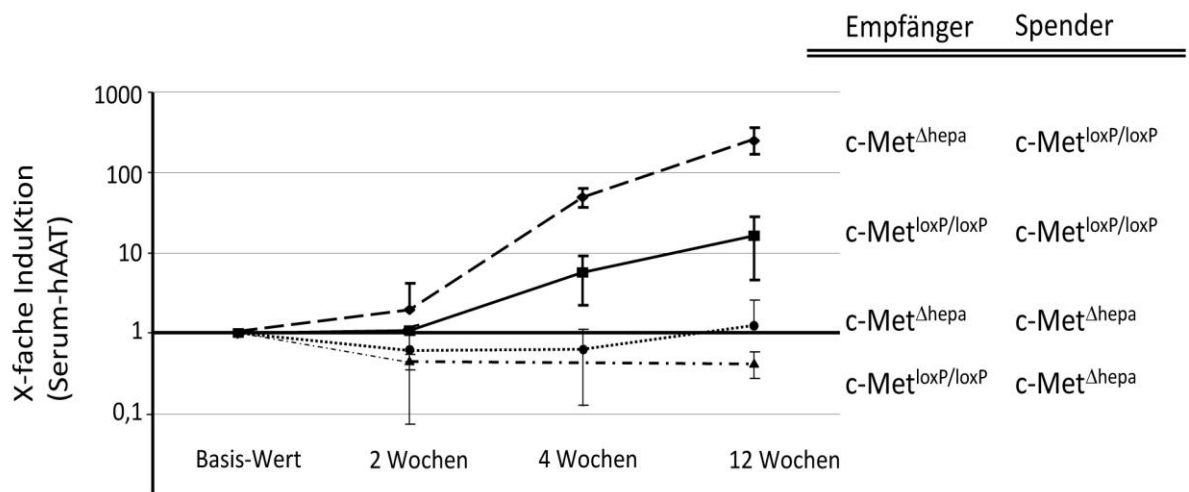
### **5.2.1. c-Met in Donorhepatozyten ist essentiell für eine erfolgreiche Repopulation**

Zunächst wurde die Rolle des c-Met Rezeptors in Donorhepatozyten untersucht. Es wurden c-Met-defiziente, hAAT-transgene Spenderhepatozyten (c-Met<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+)) in konditionierte c-Met<sup>loxP/loxP</sup> und c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertiere transplantiert. Die folgende Analyse der Serum-hAAT Expression ergab zu jedem untersuchten Zeitpunkt einen Abfall unter den Basiswert (Abb. 5.3). Dies trifft auf beide Empfängergruppen (c-Met<sup>loxP/loxP</sup>, c-Met<sup>Δhepa</sup>) zu. Da die gemessenen Werte konstant unter dem Ausgangsniveau blieben, musste davon ausgegangen werden, dass es zu keiner Repopulation in Empfängermausen gekommen ist.

### 5.2.2. c-Met-Defizienz in Empfängertieren begünstigt positive Selektion von WT-Spenderzellen

Die Konditionierung durch Bestrahlung, KMT, Retrorsine und PH soll eine positive Selektion der Donorhepatozyten in der Empfängerleber bewirken und zu einem Anwachsen mit fortschreitender Repopulation führen. Zunächst wurde untersucht, ob ein durch dieses Konditionierungsprotokoll ausgelöster Selektionsdruck ausreichend für eine erfolgreiche Repopulation ist. Dazu wurden c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Donorhepatozyten in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfänger nach vorangegangener Konditionierung transplantiert. Die Messung des Serum-hAAT Wertes ergab zwölf Wochen nach Transplantation einen 12-fachen Anstieg zum Basiswert. Dies zeigt, dass die Vorbehandlung zu einem ausreichenden Selektionsdruck führt, welcher auf die Spenderzellen wirkt.

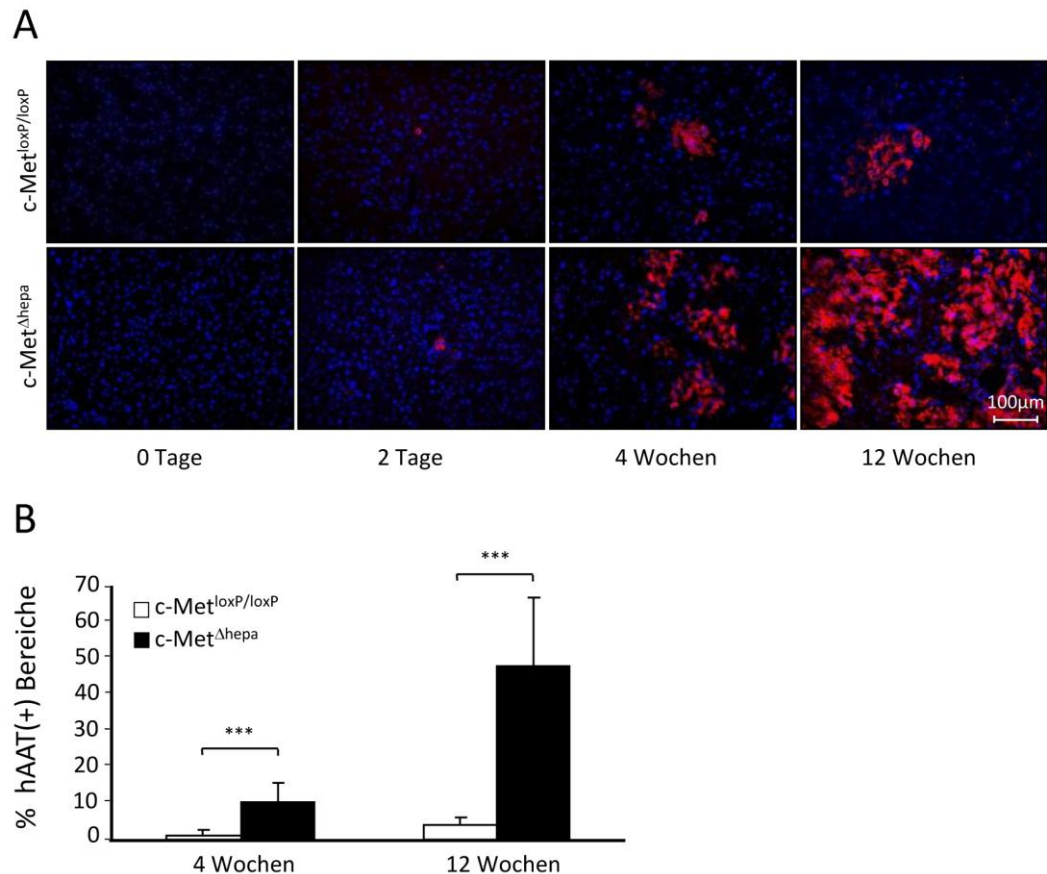
Wie in 5.2.1 gezeigt wurde, hat das Fehlen des c-Met Rezeptors in Donorhepatozyten einen negativen Einfluss auf eine mögliche Repopulation. Deshalb führte der nächste Schritt dazu, den Einfluss des c-Met Rezeptors in Empfängertieren auf den Repopulationserfolg zu untersuchen. c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäuse wurden nach vorangegangener Konditionierung mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Spenderhepatozyten transplantiert. Die Analyse ergab einen 250-fachen Anstieg des Serum-hAAT Gehaltes zwölf Wochen nach HT. Dies ist ein mehr als 20-fach höherer Anstieg verglichen mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren zu (Abb. 5.3).



**Abbildung 5.3: Ansiedlung transplantierte Spenderzellen im Empfängergerewebe.**

Die Hepatozytentransplantation (HT) erfolgte durch c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) und c-Met<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+) Spendertiere in jeweils c-Met<sup>loxP/loxP</sup> und c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertiere. Bestimmung des hAAT Wertes im Serum mittels ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten nach HT. Basiswert ist der Mittelwert der Serum-hAAT Werte 24h nach HT aus den Tieren der entsprechenden Gruppe. Die gemessenen Serum-hAAT Werte der späteren Zeitpunkte wurden auf den 24 Stunden-Wert normiert.

Die Korrelation zwischen einem erhöhten Serum-hAAT Gehalt und der Ausbreitung der Spenderhepatozyten in der Empfängerleber wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung des Markerproteins hAAT bestätigt. Es zeigten sich mehr fluoreszenzmarkierte hAAT-positive Zellen in c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen verglichen mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren (Abb. 5.4A). Die clusterförmige Anordnung der Spenderhepatozyten erlaubte eine Quantifizierung hAAT-positiver Spenderzellbereiche mit Hilfe der Software Axiovision. Die Auswertung ergab vier Wochen nach HT bereits eine signifikante Erhöhung um das 5-fache in c-Met<sup>Δhepa</sup> Tieren. Zwölf Wochen nach HT wiesen c-Met<sup>Δhepa</sup> Tiere die 10-fache Fläche an hAAT-exprimierenden Zellbereichen auf (Abb. 5.4B).



**Abbildung 5.4: Verstärkte Repopulation in c-Met<sup>Δhepa</sup> Tieren.**

**A:** Immunfluoreszenzfärbung transplanterter Hepatozyten durch den Spenderzellmarker hAAT (rot: hAAT(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit DAPI). **B:** Quantifizierung der Fluoreszenzfärbung durch Ausmessung der hAAT(+) Bereiche mit der Software Axiovision.

### 5.2.3. Die Deletion des c-Met Rezeptors ist ausreichend für eine positive Selektion der Spenderhepatozyten

Wie bisher gezeigt werden konnten, spielt der HGF Rezeptor c-Met eine essentielle Rolle bei der *in vivo* Repopulation im Modell der Hepatozytentransplantation. Im Folgenden sollte geklärt werden, inwieweit die Konditionierung der Empfängertiere durch Bestrahlung, KMT, Retrorsine und PH Einfluss auf den Repopulationserfolg durch Spenderhepatozyten nimmt. Die Hepatozytentransplantation erfolgten jeweils vier Wochen nach Bestrahlung. Die Repopulation wurde durch Messen des Serum-hAAT Wertes sowie durch Immunfluoreszenzfärbung hAAT-positiver Zellen vier und zwölf Wochen nach HT gemessen.



Zunächst wurden c-Met<sup>loxP/loxP</sup> und c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäuse mittels lethaler Bestrahlung, KMT und der Gabe von Retrorsine konditioniert. Das Setzen des Proliferationsstimulus durch PH wurde in dieser Versuchsgruppe ausgelassen. Die Hepatozytentransplantation erfolgte mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Spenderzellen vier Wochen nach Bestrahlung. Dabei ergab die Messung der Serum-hAAT Werte ergab einen 50-fachen Anstieg in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren verglichen mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren, bei denen keine erhöhten Serum-hAAT Werte gemessen werden konnten (Abb. 5.5A).

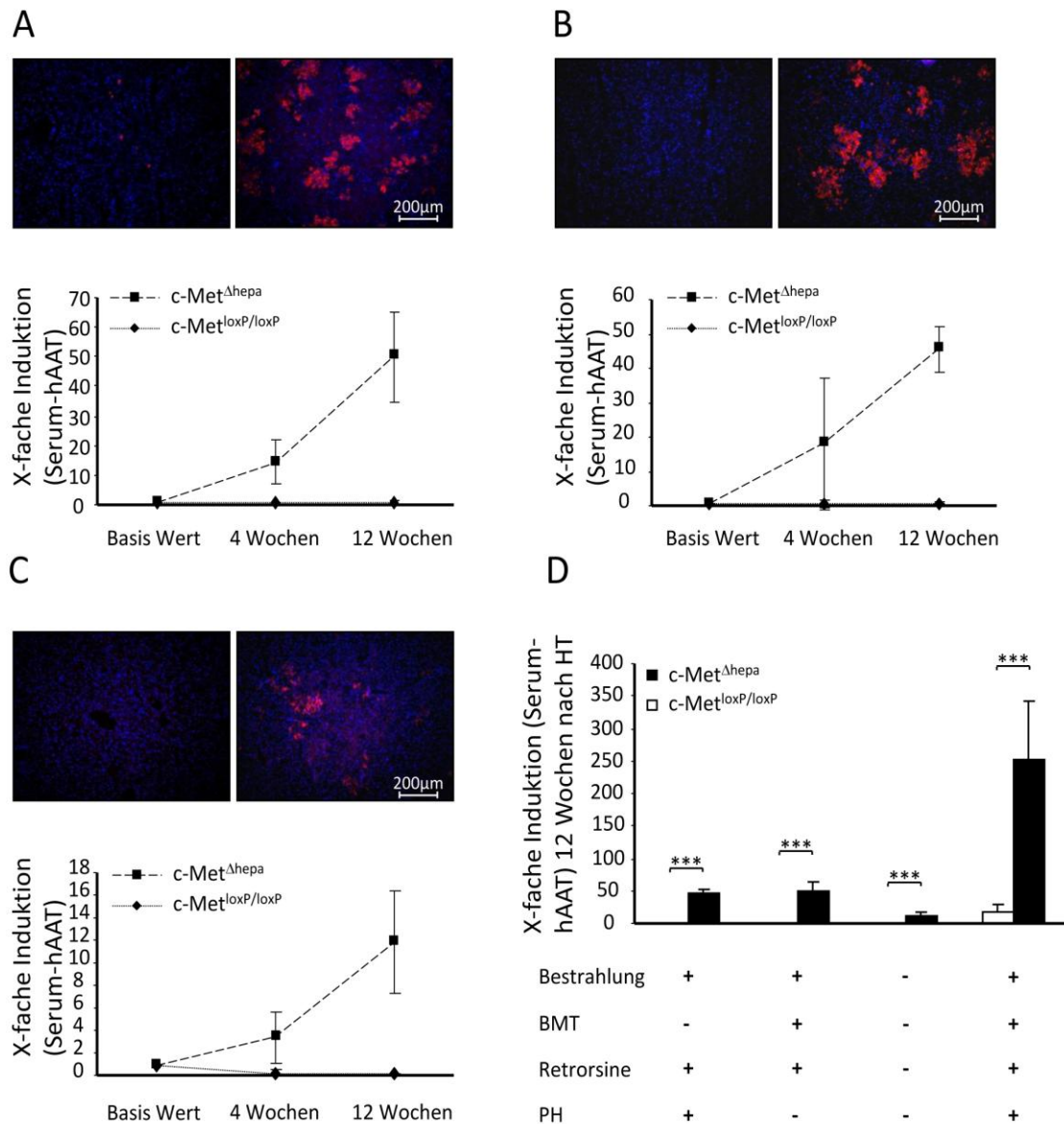
In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der Knochenmarkstransplantation auf die Repopulation untersucht. Dazu wurden die Empfängertiere mittels abdominalen Bestrahlung, Retrorsine und PH vorbehandelt. Der Unterschied zur kompletten Vorbehandlung besteht in diesem Fall in der Bestrahlung. Hier wurde nicht die komplette Maus, sondern lediglich der abdominale Bereich, in dem die Leber lokalisiert ist, exklusive der Extremitäten, bestrahlt. Dadurch wird eine Knochenmarkstransplantation überflüssig. Die Blenden der Strahlungsquelle wurden dazu bis auf einen 4 cm breiten Spalt über der Leber zugeschoben, wodurch gewährleistet wird, dass nur ein definierter Bereich der Strahlendosis von 12 Gy ausgesetzt ist. Die Mäuse wurden dazu kurzzeitig narkotisiert. Die Behandlung mit Retrorsine, sowie die Durchführung der PH und der HT erfolgten nach Protokoll. Als Spenderzellen wurden wiederum frisch isolierte c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Zellen verwendet. Die Repopulationsanalysen zeigten einen signifikanten Anstieg der Serum-hAAT Werte zwölf Wochen nach HT in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren sowie einen Abfall des Serum-hAAT Levels unter den Ausgangswert in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren (Abb. 5.5B).

Die bisherigen Repopulationsanalysen zeigten unter Verwendung verschiedener Vorbehandlungen jeweils erhöhte Leberrepopulation in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängermausen. Daher wurde im nächsten Experiment untersucht, ob alleine das Fehlen des Rezeptors c-Met ausreichend ist eine Repopulation durch Spenderhepatozyten auszulösen. Dazu wurden c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Spenderzellen in unvorbehandelte c-Met<sup>loxP/loxP</sup> und c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertiere im Alter von 10-13 Wochen transplantiert. Es zeigte sich ein 12-facher Anstieg des Serum-hAAT Wertes zwölf Wochen nach HT in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängermausen, wohingegen sich in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren kein Anstieg des Serum-hAAT Wertes nachweisen ließ (Abb. 5.5C).

Im direkten Vergleich der Serum-hAAT Werte 12 Wochen nach HT in den Gruppen, welche verschiedene Konditionierungen erfahren haben, zeigte sich eine deutlich effektivere

Repopulation in der Empfängergruppe, welche dem kompletten Konditionierungsprotokoll ausgesetzt war (Abb. 5.5D).

Im Folgenden wurden daher für die weiteren Analysen Mäuse verwendet, welche durch Bestrahlung, KMT, Retrorsine und PH konditioniert wurden.



**Abbildung 5.5: HT nach verschiedenen Konditionierungen.**

Immunfluoreszenzfärbungen und Serum-hAAT ELISA. **A:** HT nach Bestrahlung, KMT und Retrorsine, jedoch ohne PH. **B:** HT nach Bestrahlung der Leber, wobei Extremitäten und der Thorax abgeschirmt werden. Tiere wurden zusätzlich mit Retrorsine-Gabe und PH vorbehandelt **C:** HT in naïve unvorbehandelte Mäuse.

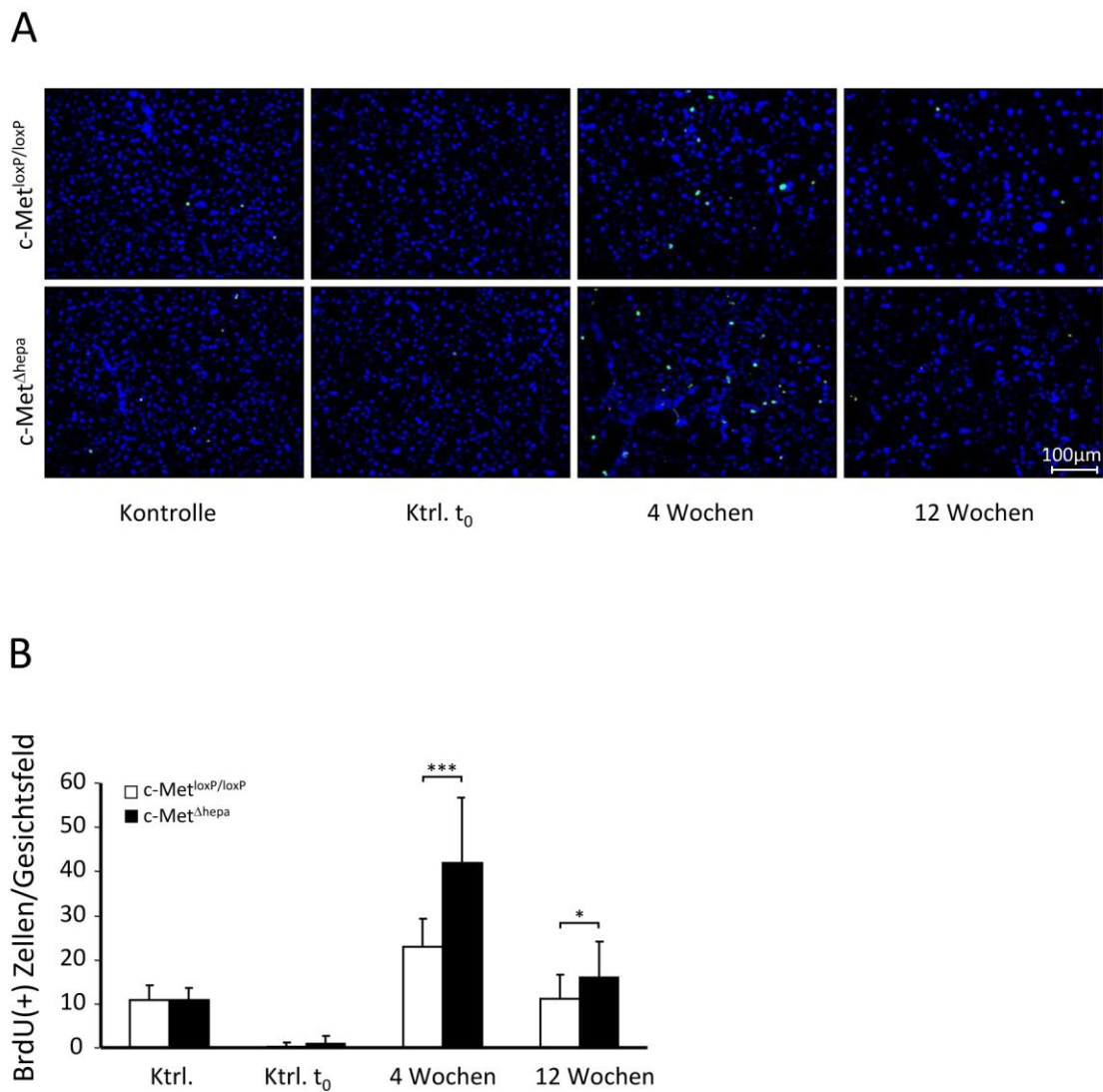
**D:** Vergleich der Serum-hAAT Werte zwölf Wochen nach HT unter dem Einfluss der verschiedenen Vorbehandlungen.

#### 5.2.4. Proliferationsanalysen in transplantierten Lebern

Weitere Untersuchungen sollen ursächlich klären welche Mechanismen der erhöhten Repopulation in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen zu Grunde liegen. Dabei wichtige zu untersuchende Punkte sind die Proliferation der Hepatozyten sowie ihre apoptotische Aktivität.

Die Rolle der Zellproliferation als einer der Hauptaspekte der Leberregeneration wurde mittels BrdU-Inkorporation untersucht. Das Thymidin-Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU) wird während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Desoxythymidintriphosphats in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Inkorporiertes BrdU kann dann durch entsprechende Antikörper auf Kryo- oder Paraffin- Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. So lässt sich eine Aussage über die im Gewebe stattfindende Proliferation treffen.

Die Injektion von 200 µl BrdU i.p. erfolgte 2 Stunden vor der Organentnahme. Aus kryokonservierten in Tissue Tek eingebetteten Leberstücken wurden Kryoschnitte gefertigt und eine Immunfluoreszenzfärbung der BrdU-positiven Zellen durchgeführt. Repräsentative Bereiche der Schnitte wurden unter dem Mikroskop fotografiert (Abb. 5.6A). Die Auswertung erfolgte durch Zählen von BrdU-positiven Zellen in 5-10 Gesichtsfeldern pro Empfängermaus in einer 100-fachen Vergrößerung. Es wurden dabei unbehandelte Kontrollen mit Proben zum Zeitpunkt der Leberresektion (Ktrl. t<sub>0</sub>), sowie Gewebe vier und zwölf Wochen nach der Hepatozytentransplantation miteinander verglichen. Die Konditionierung durch Bestrahlung, KMT und Retrorsine-Behandlung führte zum Zeitpunkt der Leberresektion zu einem deutlichen Abfall der DNA Synthese, gleichbedeutend mit einer geringeren Anzahl an BrdU positiven Zellen. Vier Wochen nach HT war die Anzahl an BrdU-positiven Zellen deutlich erhöht. In c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren konnte dabei signifikant mehr Proliferation nachgewiesen werden im Vergleich zu Lebern der c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängerermäuse. Zwölf Wochen nach HT hatte die DNA Synthese in beiden Empfängergruppen deutlich nachgelassen. Jedoch war die Anzahl BrdU-positiver Zellen in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen weiterhin signifikant erhöht im Vergleich zu c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren (Abb. 5.6B).



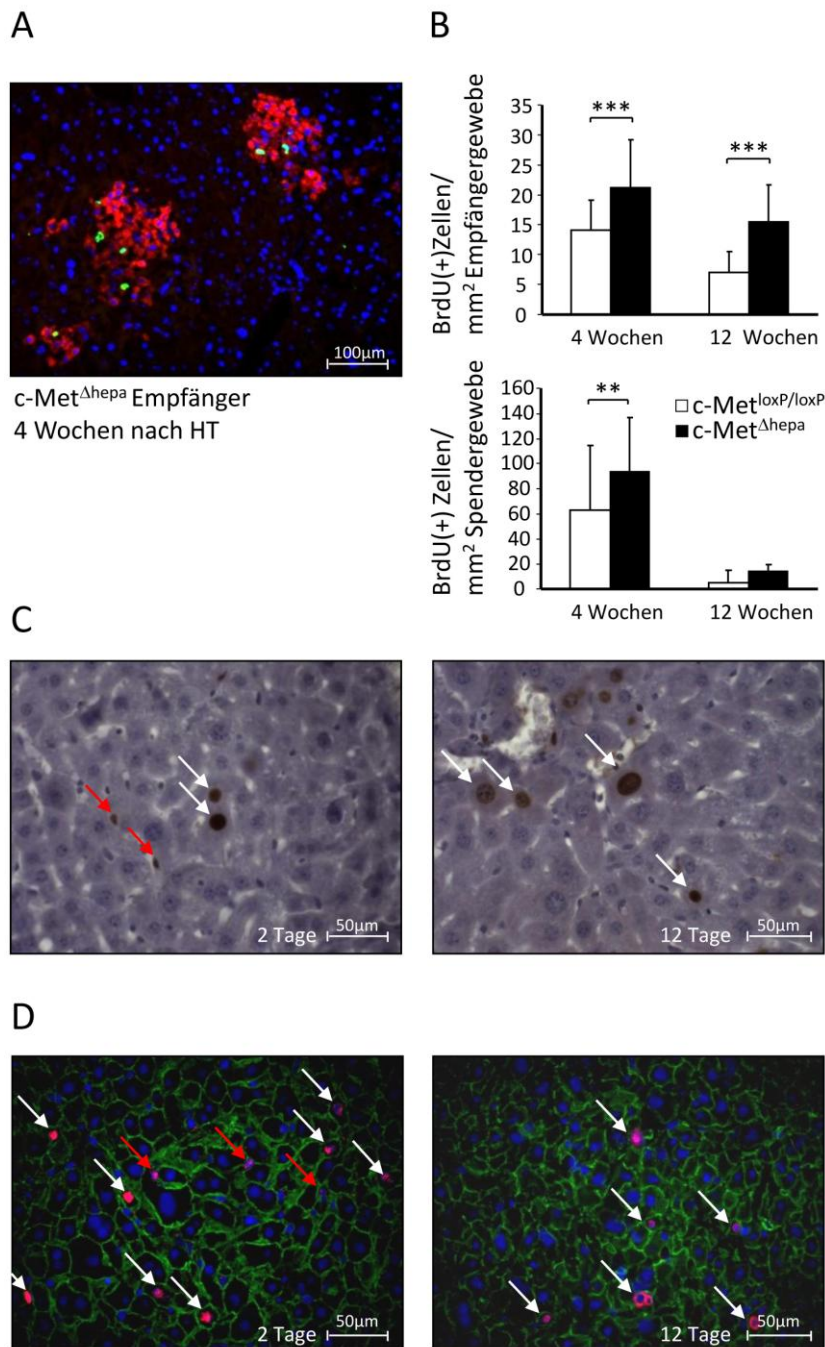
**Abbildung 5.6: Proliferationsanalysen mittels BrdU-Inkorporation.**

**A:** BrdU-Immunfluoreszenzfärbung proliferierender Zellen, welches 2 Stunden vor der Organentnahme i.p. verabreicht wurde. (grün: BrdU(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit DAPI). **B:** Quantifizierung BrdU(+) Zellen durch Zählen positiver Signale in einer 100-fachen Vergrößerung. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Ziel unserer Studien war es eine Repopulation der Leber durch transplantierte Spenderzellen zu erreichen. Für die Repopulationsanalysen war es daher interessant den Ursprung der proliferierenden Zellen zu bestimmen. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass Lebern der c-Met<sup>Δhepa</sup> Tiere sowohl vier, als auch zwölf Wochen nach HT eine erhöhte Proliferation aufweisen, waren die Proben der c-Met defizienten Empfängertiere Gegenstand der genaueren Analyse von Lage und Herkunft der proliferierenden Zellen. Dazu wurde eine Doppel-Immunfluoreszenzfärbung von BrdU-positiven Zellen sowie von Zellen, die das Markerprotein hAAT (humanes alpha 1-Antitrypsin) exprimieren, durchgeführt (Abb. 5.7A). Mit dem Software-Programm Axiovision wurde die Fläche der hAAT-positiven Bereiche, sowie der Bereiche des residenten Lebergewebes berechnet und die BrdU-positiven Zellen in beiden Bereichen gezählt. Die Auswertung ergibt die Dichte der BrdU(+) Zellen pro Flächeneinheit in beiden Bereichen.

Diese Analyse zeigte, dass die transplantierten Spenderhepatozyten vier Wochen nach HT signifikant mehr proliferierten als Zellen des residenten Empfängergewebes. Zwölf Wochen nach HT zeigten beide Gewebereiche gleich viel Proliferation. Dabei proliferierten c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerleber in beiden Gewebsarealen signifikant mehr (Abb. 5.7B).

Im Weiteren stellte sich die Frage, welcher Zelltyp der vorwiegend proliferierende ist, und ob sich dabei Unterschiede feststellen lassen, zu welchem Zeitpunkt nach HT die Proliferation untersucht wird. Dazu wurde eine immunhistochemische Färbung der BrdU positiven Zellen durchgeführt, die mit dem Substrat DAB anstatt mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper entwickelt wurde. Das erlaubt unter dem Lichtmikroskop eine Beurteilung des Zelltyps. Um eine möglichst große Zeitspanne zu untersuchen wurden die Zeitpunkte 48 Stunden und zwölf Wochen nach HT betrachtet. Morphologisch betrachtet zeigte sich, dass kurze Zeit nach HT sowohl Hepatozyten, als auch andere Zelltypen, wie Stern- oder Kupfferzellen proliferieren. Zwölf Wochen nach HT proliferierten jedoch vorwiegend Hepatozyten. Um diese Beobachtung weiter zu verifizieren wurden Doppelimmun-Fluoreszenzfärbungen des Zellwandmarkers  $\beta$ -Catenin und des weiteren Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Auch hier zeigte sich, dass 2 Tage nach HT viele Zellen von kleinerer Größe - was auf verschiedenste Zelltypen schließen lässt - proliferierten, wohingegen zwölf Wochen nach HT von der Zellgröße her, nur die größeren Zellen - Hepatozyten - positiv für Ki67 waren (Abb. 5.7D).



**Abbildung 5.7: Lokalisation der proliferierenden Zellen.**

**A:** Doppelimmunfluoreszenzfärbung hAAT(+) Spenderzellbereiche und BrdU(+) proliferierender Zellen (rot: hAAT(+); grün: BrdU(+); blau: Kernfärbung mit DAPI) in c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen. **B:** Bestimmung der Dichte proliferierender Zellen in Bereichen, die aus Spenderzellen hervorgegangen sind im Vergleich zu proliferierenden Zellen im residenten Empfängergewebe. **C:** Immunhistochemische Färbung BrdU(+) Zellen zur Beurteilung des proliferierenden Zelltyps 2 Tage und 12 Tage nach HT. **D:** Immunfluoreszente Doppelfärbung von β-Catenin und Ki67 proliferierenden Zellen. (grün: β-Catenin; rot: Ki67(+) Zellen; blau: Dapi; weiße Pfeile: Hepatozyten; rote Pfeile: nicht-parenchymatöse Leberzellen).

### 5.2.5. Analyse der apoptotischen Aktivität nach Hepatozyten-Transplantation

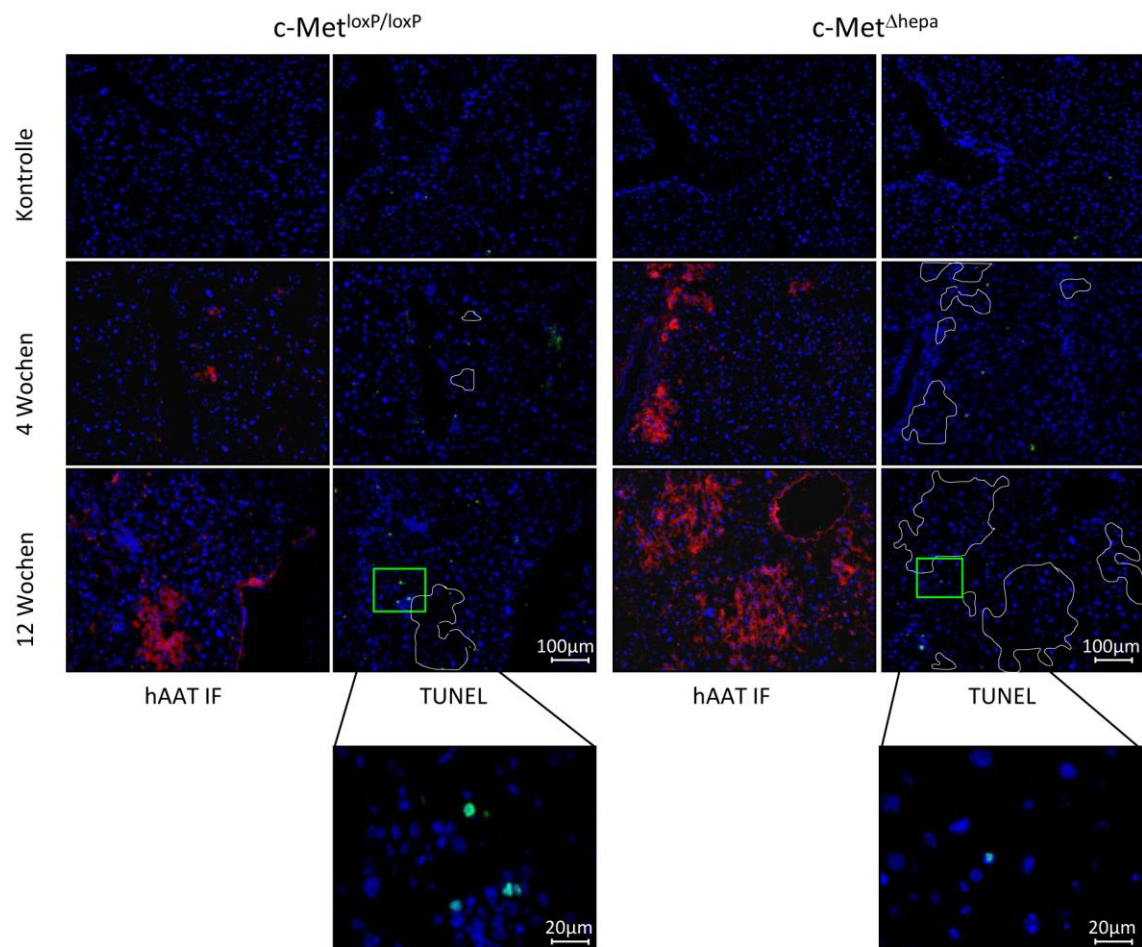
Ein weiterer Aspekt im Rahmen der Leberregeneration ist Apoptose, der programmierte Zelltod. Apoptotische Zellen können durch die TUNEL (*TDT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) Färbung sichtbar gemacht werden. Bei der Apoptose wird der DNA-Strang durch Endonucleasen fragmentiert. Das Enzym TdT (*Terminal desoxynucleotidyl transferase*) markiert die dabei frei werdenden Hydroxygruppen an den Enden der Fragmente mit Nucleotiden, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind. Die TUNEL Färbung wurde auf Kryoschnitten durchgeführt, unter dem Mikroskop in einer 200-fachen Vergrößerung fotografiert und die Menge an apoptotischen Zellen bezogen auf die Zahl der Zellkerne quantifiziert (Abb.5.8A).

Diese Analyse ergab vier Wochen nach HT in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen eine signifikant erhöhte apoptotische Aktivität. Etwa 1% der Gesamtzellzahl in c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen war zu diesem Zeitpunkt TUNEL-positiv. c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängerermäuse dagegen ließen keine erhöhte apoptotische Aktivität erkennen und hatten mit etwa 0,6 % einen vergleichbaren Wert an apoptotischen Zellen wie unbehandelte Kontrollen. Die Anzahl apoptotischer Zellen zwölf Wochen nach HT entsprach sowohl in c-Met<sup>loxP/loxP</sup>, als auch in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen den Werten unbehandelter Kontrollmäuse (Abb. 5.8B).

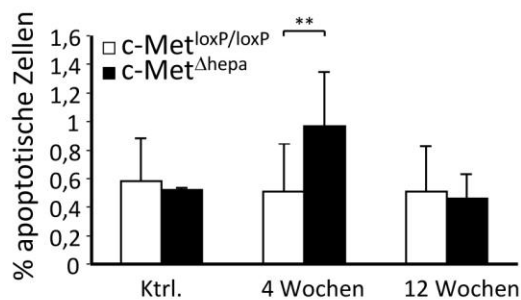
Um die Lage und Herkunft der apoptotischen Zellen genauer lokalisieren zu können wurden Serienschnitte der entsprechenden Proben angefertigt und das Markerprotein hAAT gefärbt, bzw. mittels TUNEL Färbung apoptotische Zellen sichtbar gemacht. So war es möglich zu differenzieren, ob die apoptotischen Zellen in Bereichen liegen, die von transplantierten Spenderzellen abstammen oder in Bereichen des residenten Lebergewebes. Aufgrund der erhöhten Repopulation wurde diese Analyse an c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren durchgeführt. Die Auswertung vier Wochen nach HT zeigte, dass deutlich mehr der Zellen des residenten Empfängergewebes apoptotisch waren. Damit war die Apoptoserate des Empfängergewebes signifikant erhöht verglichen mit den aus transplantierten Hepatozyten abstammenden Zellen. Auch zwölf Wochen nach HT zeigte sich eine deutliche Erhöhung der apoptotischen Aktivität in Bereichen des residenten Empfängergewebes (Abb. 5.8C).



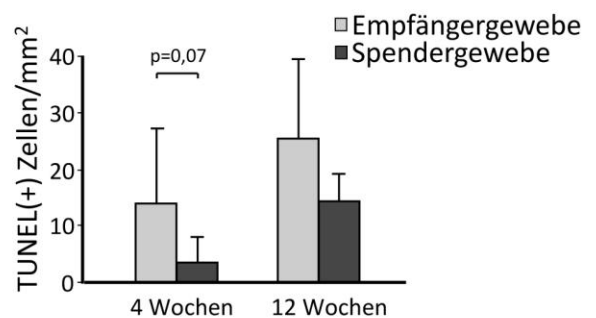
A



B



C



**Abbildung 5.8: Bestimmung der apoptotischen Aktivität mittels TUNEL Färbung.**

**A:** Immunfluoreszente Färbung des Markerproteins hAAT und apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Färbung auf Serienschnitten. Zur Lokalisation entsprechender Zellen wurden hAAT(+) Bereiche umrandet und auf den TUNEL gefärbten Schnitt übertragen. Gefäße dienen der Orientierung (rot: hAAT(+) Zellen; grün: TUNEL(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit DAPI). **B:** Quantifizierung apoptotischer TUNEL(+) Zellen im Verhältnis zu den Zellkernen. **C:** Lokalisierung apoptotischer Zellen in *c-Met* defizienten Empfängertieren.



### **5.3. Schädigung und Regeneration des Gewebes vor und nach Hepatozytentransplantation**

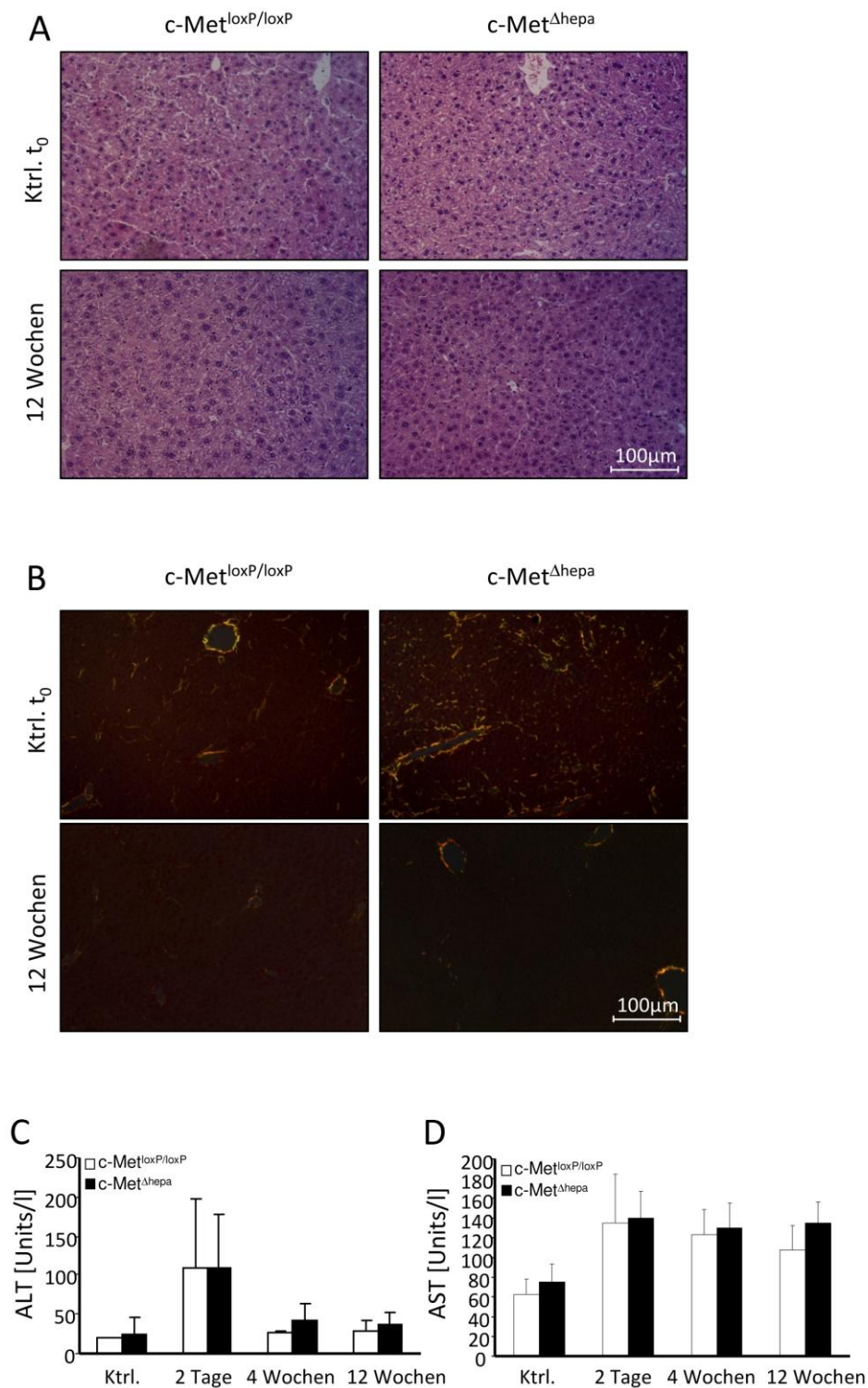
#### **5.3.1. Histologische Analysen**

Die Konditionierungen durch Bestrahlung, Knochenmarkstransplantation und Behandlung mit Retrorsine führten zur Schädigung der Leber. Diese Schädigung war die Grundlage für eine erfolgreiche Leberrepopulation durch transplantierte Spenderhepatozyten. Nachdem die Proliferation sowie die apoptotische Aktivität im Lebergewebe nach HT bereits untersucht wurde, sollten nun die histomorphologische Veränderungen vor und nach HT in den Lebern näher betrachtet werden. Dazu wurden Leberhistologien zwölf Wochen nach HT in einer H&E Färbung analysiert. Als Referenz wurden Leberschnitte von Mäusen gewählt, welche zuvor bestrahlt, knochenmarkstransplantiert und mit Retrorsine behandelt wurden. Die Lebern wurden zum Zeitpunkt der PH entnommen und deshalb als 0 Stunden Zeitpunkt (Ktrl  $t_0$ ) benannt.

Die Histologien wiesen zu keinem der beiden Zeitpunkte, weder in c-Met<sup>loxP/loxP</sup>, noch in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren histologische, mikroskopisch erkennbare Besonderheiten, nekrotische Areale oder sonstige offensichtliche Schädigungen auf (Abb. 5.9A).

Die extrazelluläre Matrix wurde durch eine Polarisationsfärbung mittels Sirius Rot sichtbar gemacht. Dabei zeigten sich deutlich mehr positive Strukturen in c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen verglichen mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Mäusen zum Zeitpunkt 0 Stunden (Ktrl.  $t_0$ ). Betrachtet man derart gefärbte Schnitte zwölf Wochen nach HT, waren praktische keine Sirius-Rot-positiven Strukturen mehr erkennbar (Abb. 5.9B).

Die Messung der Leber-Transaminasen ALT und AST zeigte eine deutliche Erhöhung 48 Stunden nach HT. Bereits vier Wochen später hatten sich die ALT-Werte normalisiert, AST-Werte blieben hingegen weiterhin erhöht. Dabei zeigten c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängermäuse zwar nicht signifikant, aber dennoch tendenziell erhöhte Werte (Abb. 5.9C, D).



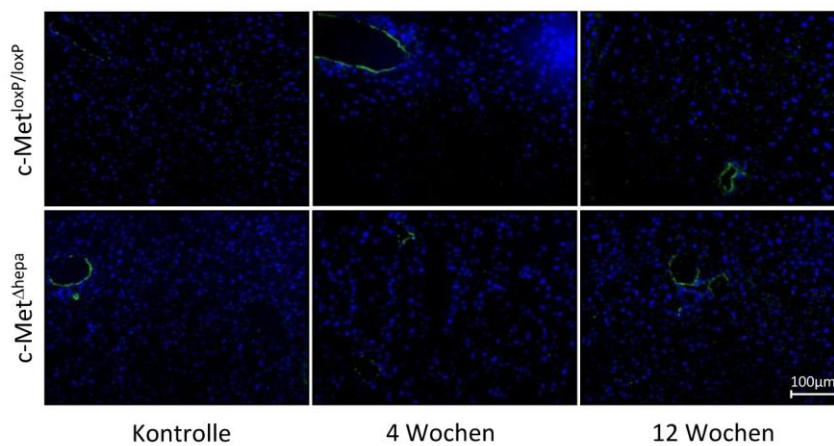
**Abbildung 5.9: Analyse von Histologien und Matrixsynthese.**

Es wurde der Zeitpunkt zwölf Wochen nach HT in der H&E Färbung sowie in der Sirius Rot Färbung betrachtet. Als Referenz wurden 0 Stunden Lebern hinzugezogen (Ktrl  $t_0$ ). Dies ist zum Zeitpunkt der PH vier Wochen nach KMT. **A:** Histologie in der H&E Färbung. **B:** Färbung von Collagenfasern mit Sirius Rot. **C, D:** Leber-Transaminasen AST und ALT.

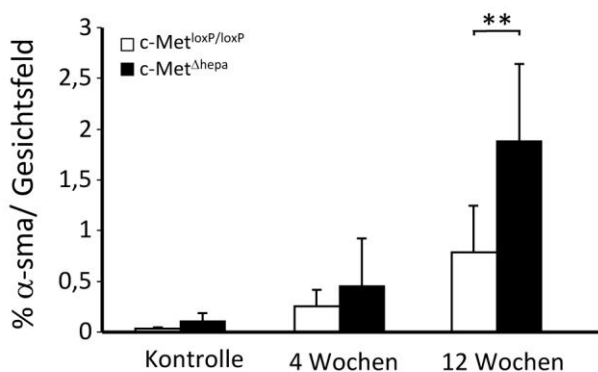
### 5.3.2. Darstellung von Leber-Umbauzeichen nach Hepatozytentransplantation

Umstrukturierungen in der Leber gehen in der Regel mit der Synthese von Collagenfasern einher. Collagen wird von Myofibroblasten, den sogenannten aktivierten Sternzellen, synthetisiert. Aktivierte Sternzellen wurden auf Kryoschnitten anhand einer  $\alpha$ -sma Färbung sichtbar gemacht. Von den Proben wurden mikroskopische Aufnahmen der  $\alpha$ -sma-Fasern mit identischer Lichtintensität gemacht, und diese dann densitometrisch mittels Image J ausgewertet. Dabei zeigte sich eine mit dem Zeitverlauf nach HT ansteigende Zahl aktivierter Sternzellen, welche besonders zwölf Wochen nach HT in den c-Met <sup>$\Delta$ hepa</sup> Empfängermäusen signifikant erhöht war (Abb. 5.10).

**A**



**B**

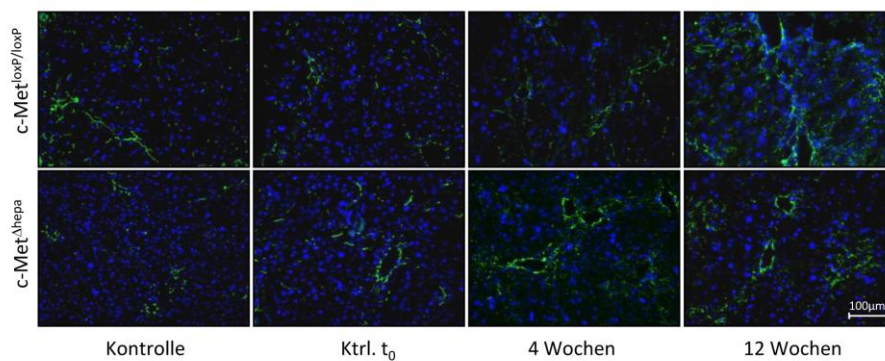


**Abbildung 5.10: Immunfluoreszenzfärbung aktivierter Sternzellen**

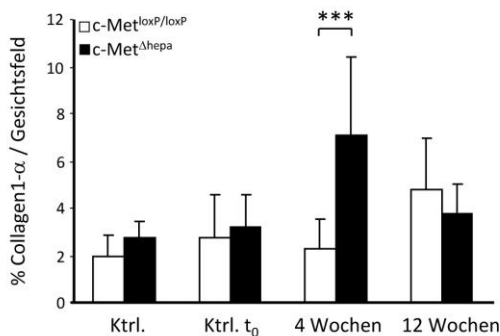
**A:** Immunfluoreszenzfärbung  $\alpha$ -sma positiver Bereiche vier und zwölf Wochen nach HT (grün:  $\alpha$ -sma; blau: Kernfärbung mit DAPI). **B:** Densitometrische Auswertung der  $\alpha$ -sma positiven Signale.

Die aktivierten Sternzellen stellen den Hauptsyntheseort von extrazellulärer Matrix dar. Daher wurde im nächsten Schritt die Synthese von Collagen-1 $\alpha$  anhand von Immunfluoreszenzfärbungen und der Messung der Expression von Collagen-mRNA mittels quantitativer Realtime PCR untersucht. Immunfluoreszenzgefärbte Collagenfasern wurden mit identischer Expositionszeit fotografiert und densitometrisch mittels Image J quantifiziert. Die Analyse ergab eine signifikante Erhöhung der Collagen-1 $\alpha$  Akkumulation vier Wochen nach HT, welche in den c-Met $\Delta$ hepa Empfängertieren verglichen mit c-Met $^{loxP/loxP}$  Empfängertieren signifikant erhöht war. Zwölf Wochen nach HT zeigte sich nur noch eine leichte Erhöhung der Collagen-1 $\alpha$  Akkumulation (Abb. 5.11A, B). Die Analyse der Induktion von Collagen auf mRNA-Ebene mittels quantitativer realtime PCR unterstrich dieses Ergebnis durch die verstärkte Expression von Pro-Collagen-1 $\alpha$  mRNA vier Wochen nach HT in den c-Met $\Delta$ hepa Empfängertieren (Abb. 5.11C).

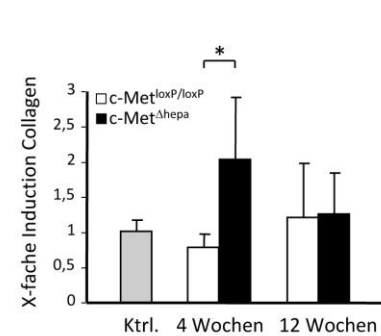
A



B



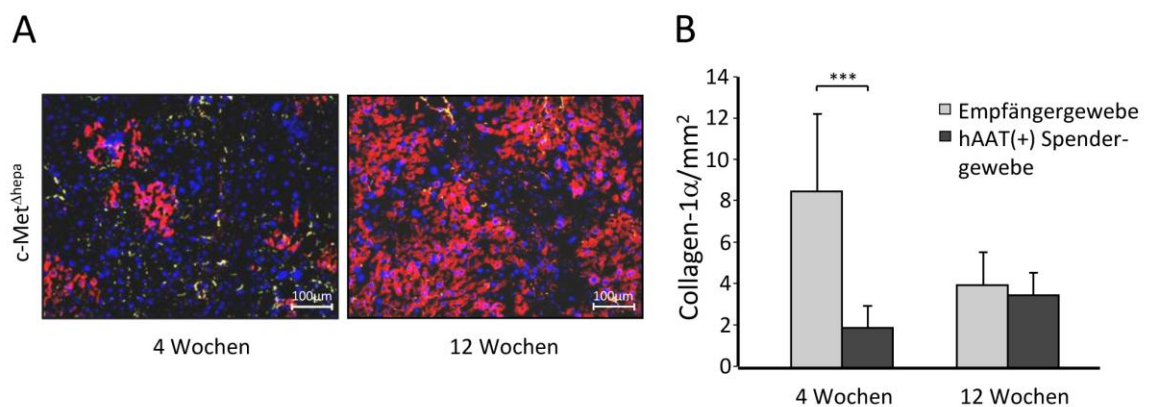
C



#### Abbildung 5.11: Collagenakkumulation nach HT

**A:** Immunfluoreszenzfärbung von Collagen-1 $\alpha$  Fasern zum Zeitpunkt der PH (Ktrl. T<sub>0</sub>), vier und zwölf Wochen nach HT. (grün: Collagen-1 $\alpha$  Fasern; blau: Kernfärbung mit DAPI). **B:** Densitometrische Quantifizierung der angefärbten Collagen-1 $\alpha$  Fasern mit ImageJ. **C:** Bestimmung der Pro-Collagen mRNA Expression mittels quantitativer realtime-PCR.

Um im nächsten Schritt die Ansammlung an Collagen-1 $\alpha$  in c-Met <sup>$\Delta$ hepa</sup> Empfängermäusen zu lokalisieren, wurde eine Doppelfärbung von hAAT(+) Spenderzellbereichen sowie der Collagen-1 $\alpha$  Fasern vorgenommen (Abb. 5.12A). Die densitometrische Auswertung der Dichte der Collagen-1 $\alpha$  Akkumulation sowohl in Spenderzellbereichen als auch in residentem Empfängerorgewebe zeigte eine signifikant erhöhte Ansammlung an Collagen-1 $\alpha$  Fasern in Bereichen, die aus transplantierten Zellen hervorgegangen sind, vier Wochen nach HT. Zum Zeitpunkt zwölf Wochen nach HT hatte sich die Collagen-1 $\alpha$  Akkumulation deutlich verringert, und es gab keine signifikanten Unterschiede in der Lokalisation (Abb. 5.12B).

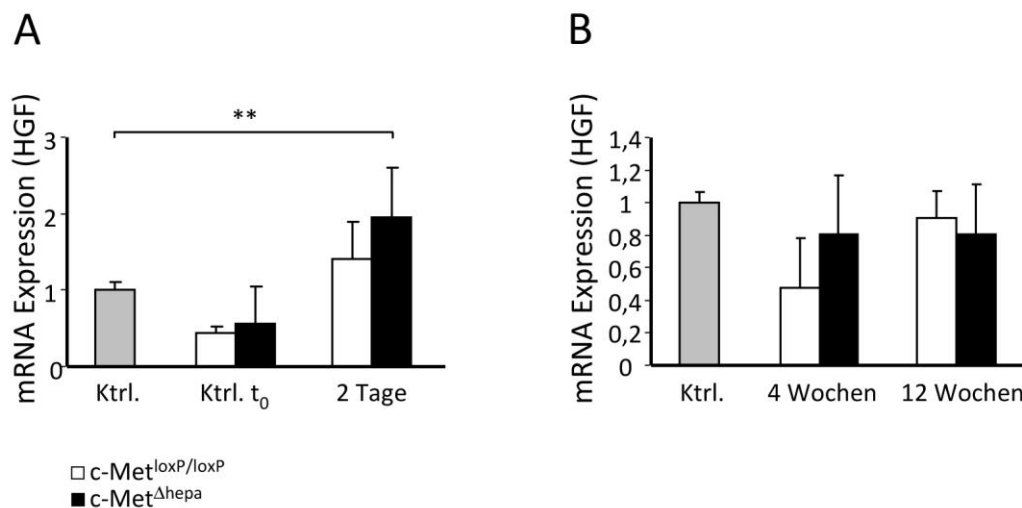


**Abbildung 5.12: Lokalisierung der Collagenansammlungen.**

**A:** Doppelfärbung von hAAT(+) Spenderzellarealen und Collagenfasern in c-Met <sup>$\Delta$ hepa</sup> Empfängertieren (rot: hAAT (+) Zellen; gelb: Collagenfasern; grün: Doppelfärbung von Collagenfasern und hAAT; blau: Kernfärbung mit DAPI). **B:** Densitometrische Auswertung der Dichte an Collagenfasern in hAAT(+) Spenderzellbereichen verglichen mit Collagen in residentem Gewebe.

#### 5.4. Aktivierung von HGF/c-Met induzierten intrazellulären Signalwegen

Die Analyse der HGF Expression als einzigem spezifischem Liganden des Rezeptors c-Met wurde anhand der mRNA Expression mittels quantitativer realtime PCR untersucht. Dabei zeigte sich eine Abnahme der HGF mRNA Expression (Ktrl.  $t_0$ ) nach der Vorbehandlung der Empfängermaüse mittels Bestrahlung, KMT, Retrorsine zum Zeitpunkt der partiellen Hepatektomie. Weiterhin zeigte sich eine signifikante Erhöhung der HGF mRNA Expression 48 Stunden nach erfolgter HT (Abb. 5.13A). Es bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen  $c\text{-Met}^{\text{loxP/loxP}}$   $c\text{-Met}^{\Delta\text{hepa}}$  Empfängertieren. Die Untersuchung zu späteren Zeitpunkten zeigte, dass die Erhöhung der HGF mRNA Expression nur vorübergehend stattfand und sowohl vier als auch zwölf Wochen nach HT nicht mehr nachweisbar war (Abb. 5.13B).

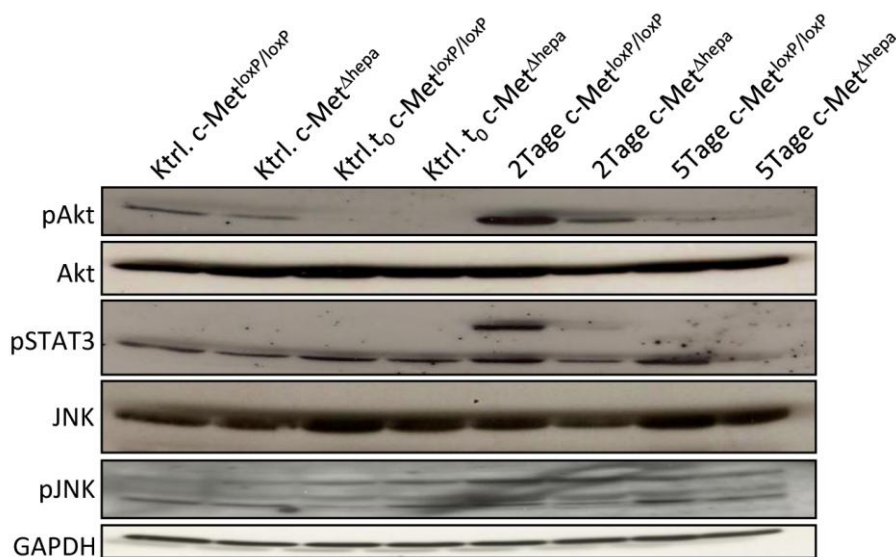


**Abbildung 5.13: HGF Expression nach HT.**

**A:** Analyse der HGF Expression auf mRNA Ebene mittels quantitativer realtime PCR zu frühen Zeitpunkten nach HT. **B:** HGF mRNA Expression vier und zwölf Wochen nach HT.

In weiteren Untersuchungen wurde die Aktivierung HGF/c-Met abhängiger intrazellulärer Signalwege auf Protein-biochemischer Basis im Western Blot analysiert. Dazu wurden sowohl unbehandelte Kontrollen, als auch Kontrollen mit Bestrahlung, KMT und Retrorsine zum Zeitpunkt der PH (Ktrl.  $t_0$ ) gewählt. Als Analysezeitpunkte nach erfolgter HT wurden 24 Stunden sowie 5 Tage nach HT gewählt.

Nach Bestrahlung, KMT, Retrorsine zeigten die Empfängertiere keine Phosphorylierung der Proteinkinase AKT und des Transkriptionsfaktors STAT3, verglichen mit unbehandelten Kontrollen. 24 Stunden nach HT zeigten c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängerermäuse eine deutliche Aktivierung der ATK und STAT3 Phosphorylierung, wohingegen c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfänger nur eine leicht induzierte Aktivierung aufwiesen. Die Expression von JNK war ebenfalls 2 Tage nach HT erhöht, jedoch war kein signifikanter Unterschied zwischen c-Met<sup>loxP/loxP</sup> und c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängern festzustellen. Die Aktivierung dieser HGF/c-Met abhängigen Signalwege war jedoch nur vorübergehend, da bereits 5 Tage nach HT im Western Blot keine erhöhte Phosphorylierung mehr nachweisbar war (Abb. 5.14).



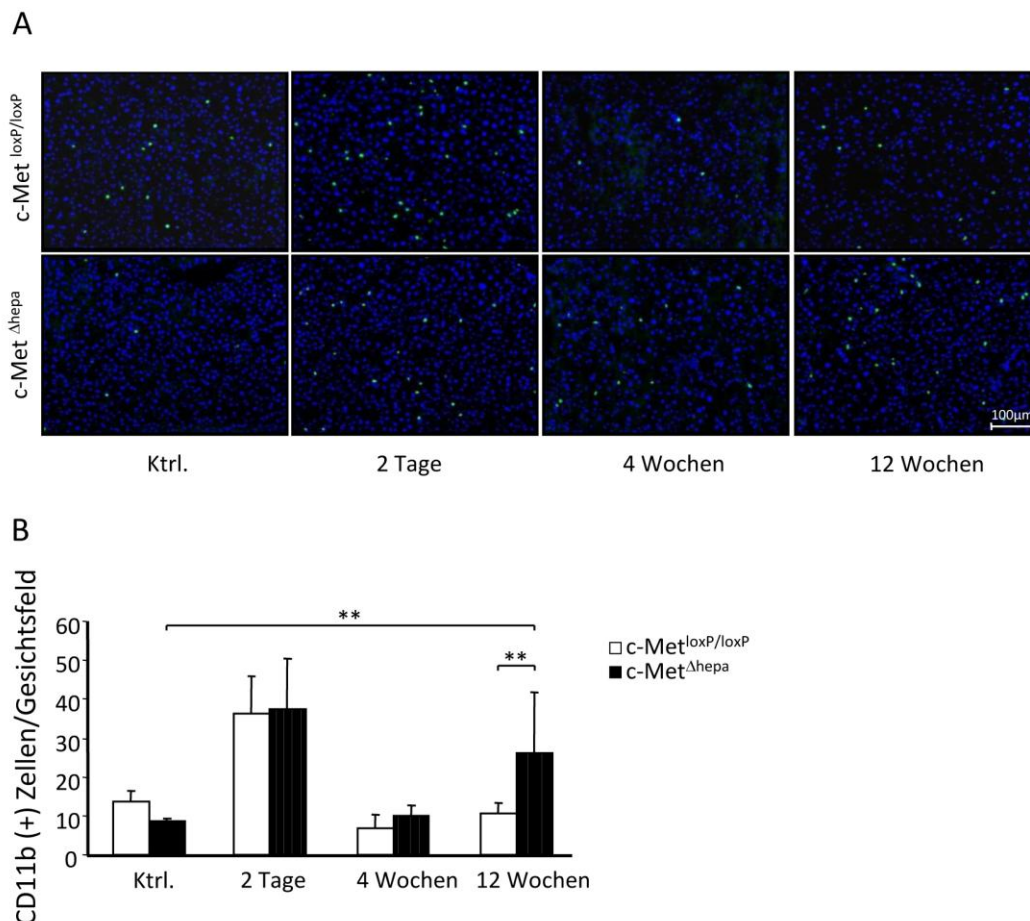
**Abbildung 5.14: Proteinexpression HGF/c-Met abhängiger Signalwege.**

Western-Blot Analyse der HGF/c-Met abhängigen Signalwege Akt und JNK sowie ihrer phosphorylierten Form und STAT3. Untersucht wurden unbehandelte Kontrollen, Kontrollen zum Zeitpunkt  $t_0$ , sowie Gewebe 2 und 5 Tage nach HT.



### 5.5. Rolle des Immunsystems im Rahmen der Hepatozytentransplantation

Noch weitgehend unklar ist die Rolle immunologischer Vorgänge im Rahmen der Selektion transplanterter Zellen. Daher war es unumgänglich auch die inflammatorischen Veränderungen nach HT genauer zu betrachten. Dazu wurden zunächst die Monozyten als wichtige Fraktion der inflammatorischen Immunzellen untersucht. Durch die Markierung mit dem Oberflächenmarker CD11b wurden die Monozyten im Fluoreszenzbild auf Kryoschnitten sichtbar gemacht (Abb. 5.15A). Die Auswertung ergab erhöhte Werte 48 Stunden nach HT, welche sich 4 Wochen nach HT bereits wieder normalisiert hatten. Interessanterweise zeigten c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängermause zwölf Wochen nach HT wieder signifikant erhöhte Entzündungswerte verglichen mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren (Abb. 5.15B).

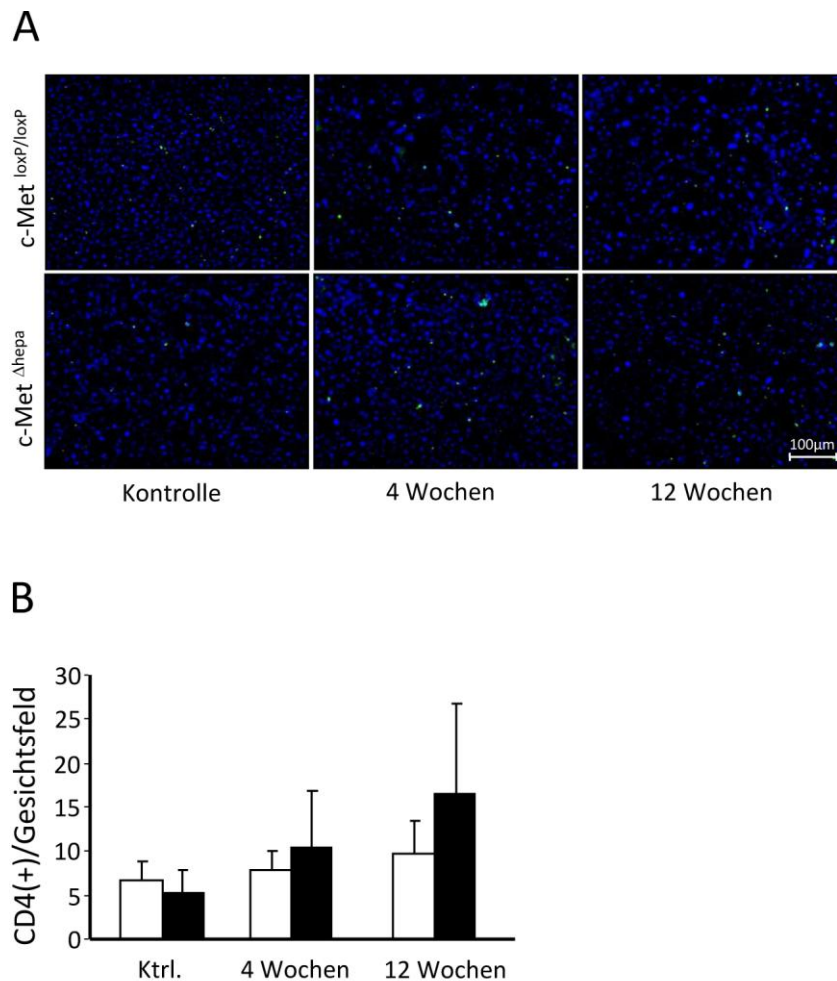


**Abbildung 5.15: Analyse der inflammatorischen Antwort nach HT.**

**A:** Immunfluoreszenz Färbung des Oberflächenmarkers CD11b, der sämtliche Immunzellen und vor allem Monozyten markiert (grün: CD11b(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit Dapi). **B:** Quantifizierung CD11b(+) Zellen.

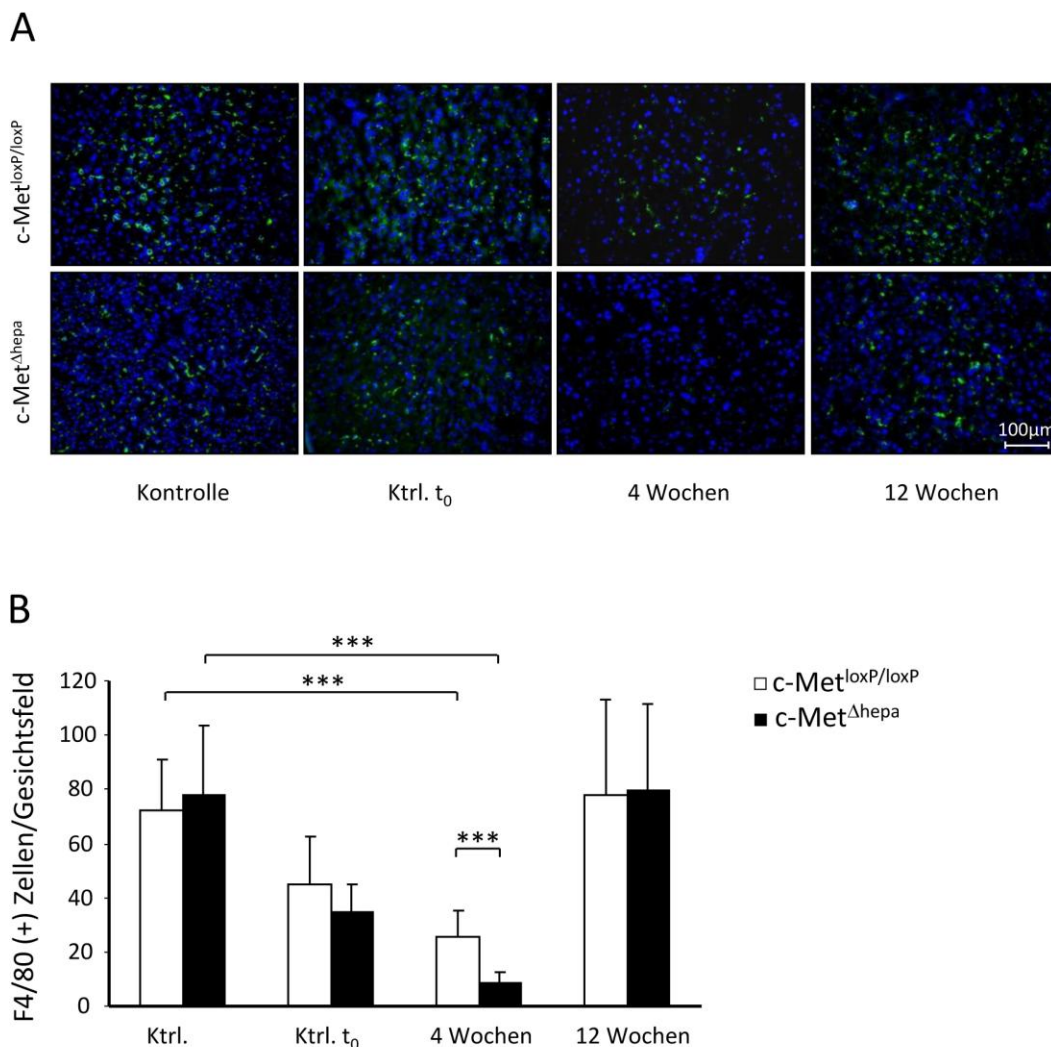


Da bereits gezeigt werden konnte, dass CD4 positive Zellen, ein Oberflächenmarker, der vor allem durch T-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, eine bedeutende Funktion bei der Zellselektion nach HT haben, wurde die Infiltration von CD4 Zellen anhand von Immunfluoreszenzfärbungen analysiert (Abb. 5.15A). Die Quantifizierung ergab jedoch nur einen leichten Anstieg CD4(+) Zellen nach HT, mit tendenziell höherer Infiltration in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen (Abb. 5.16B).



**Abbildung 5.16: Markierung von T-Lymphozyten mit dem Oberflächenmarker CD4.**  
**A:** Immunfluoreszenzfärbung mit CD4 vier Wochen und zwölf Wochen nach HT (grün: CD4(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit Dapi). **B:** Quantifizierung der CD4(+) Zellen.

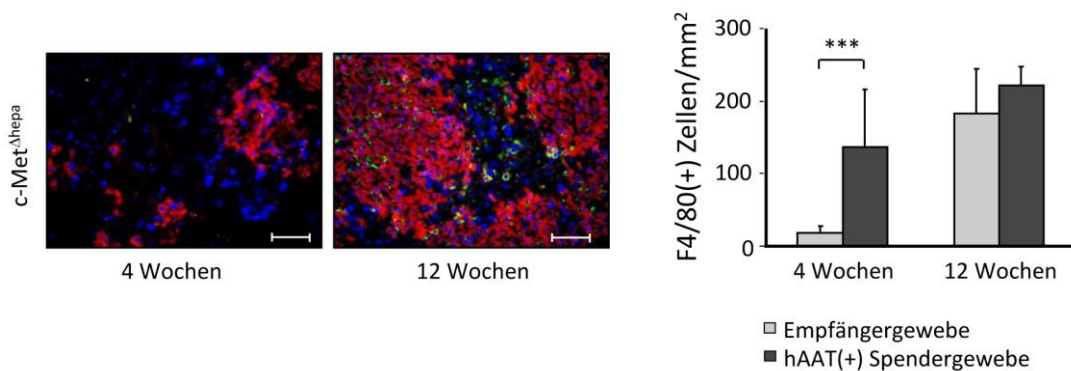
Die Leber enthält an der Innenseite der Lebersinusoiden gelegen residente Makrophagen, welche sich aus Monozyten differenzieren können. Diese sogenannten Kupffer-Zellen, oder auch Sternzellen, korrelieren in gewisser Weise mit der Schädigung der Leber. Die Analyse der F4/80 positiven Kupffer-Zellen per Immunfluoreszenzfärbung zeigte einen deutlichen Abfall der Anzahl der residenten Makrophagen vier Wochen nach HT (Abb. 5.17A). Bereits die Vorbehandlung durch Bestrahlung, KMT und Retrorsine-Gabe ließ die Anzahl an Makrophagen sinken. Zwölf Wochen nach HT jedoch normalisierten sich die Werte. Zum vier Wochen Zeitpunkt zeigten c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren signifikant weniger F4/80 positive Zellen. Bei der Analyse weiterer Zeitpunkt gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen c-Met<sup>loxP/loxP</sup> und c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren (Abb. 5.17B).



**Abbildung 5.17: Analyse der Makrophagen-Aktivierung.**

**A:** Immunfluoreszenzfärbung von F4/80(+) Makrophagen (grün: F4/80(+) Zellen; blau: Kernfärbung mit Dapi). **B:** Quantifizierung durch Auszählen der F4/80(+) Zellen.

Lokalisationsanalysen der F4/80(+) Makrophagen durch Doppelfärbung mit dem Markerprotein hAAT in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren zeigte vier Wochen nach HT eine signifikant stärkere Reduktion der F4/80(+) Makrophagen im residenten Empfängergewebe verglichen mit dem aus Spenderhepatozyten hervorgegangenen hAAT(+) Leberzellgewebe. Zwölf Wochen nach HT hatte sich die Anzahl an F4/80(+) Zellen deutlich erhöht. Die Dichte der F4/80(+) Zellen war in beiden untersuchten Geweben gleich hoch (Abb.5.18A, B).



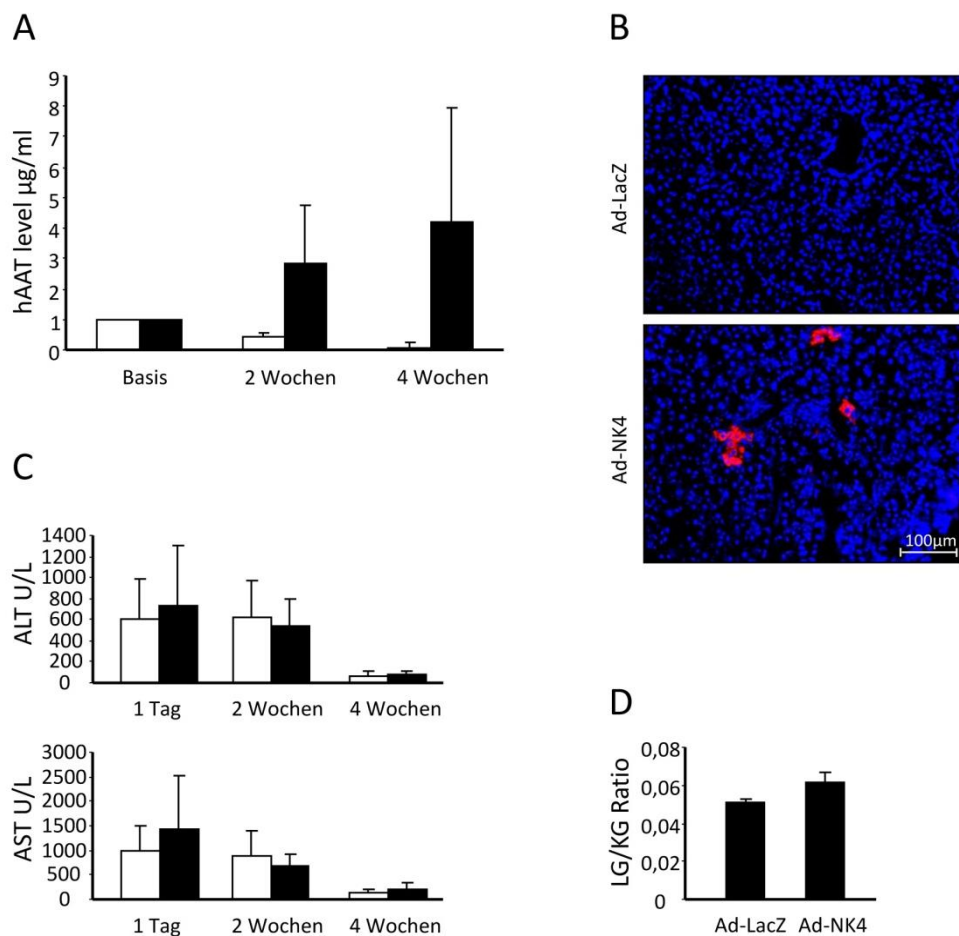
**Abbildung 5.18: Lokalisierung der F4/80(+) Zellen in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängermäusen.**

**A:** Doppelimmunfluoreszenzfärbung von hAAT(+) Bereichen und F4/80(+) Zellen in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren vier und zwölf Wochen nach HT. **B:** Die Quantifizierung der Dichte der F4/80(+) Makrophagen sowohl in Bereichen des residenten Empfängergewebes, als auch in aus hAAT(+) Spenderzellen hervorgegangenem Gewebe.

### **5.6. Inhibierung des c-Met Signalwegs durch den HGF-Antagonisten NK4**

Durch Verwendung konditionaler c-Met *knockout* Mäuse konnte eine positive Selektion der transplantierten Spenderzellen im direkten Vergleich zu Wildtyp Empfängertieren erreicht werden. Daher stellt eine Inhibierung des c-Met Rezeptors einen möglichen neuen therapeutischen Ansatz zur Steigerung der Zellselektion transplanterter Hepatozyten dar. Die Inhibierung kann prinzipiell erreicht werden durch verschiedene Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Inhibitoren, die am c-Met Rezeptor eingreifen, oder auch durch Antagonisierung des Liganden HGF. NK4 ist ein Molekül, welches durch Elastaseverdau aus HGF gewonnen wird, wirkt als HGF Antagonist. NK4 bindet kompetitiv an den c-Met Rezeptor, führt jedoch nicht zu dessen Transphosphorylierung und setzt keine HGF/c-Met-abhängigen Signalkaskaden in Gang. Dieses Prinzip sollte durch den Einsatz von NK4 überexprimierenden adenoviralen Vektoren genutzt werden.

Zwölf Wochen alte unkonditionierte Mäuse wurden mit einem NK4-überexprimierenden Adenovirus infiziert. Die Kontrollgruppe wurde mit einem LacZ-exprimierenden Adenovirus (Adeno-LacZ) behandelt. Darauf erfolgte 48 Stunden nach der Injektion die Transplantation von  $1 \times 10^6$  c-Met<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Hepatozyten. Die Serum-hAAT Werte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen und die Organentnahme vier Wochen nach HT vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass Mäuse, die mit dem Adeno-NK4 behandelt wurden deutlich erhöhte Serum-hAAT Werte zeigten im Vergleich zu Adeno-LacZ behandelten Tieren (Abb. 5.19A). Das fehlende Anwachsen der Spenderzellen konnte durch die immunologische Anfärbung des Markerproteins hAAT bestätigt werden. Diese zeigte, dass in Adeno-LacZ behandelten Mäusen keine hAAT-positiv angefärbten Zellen zu finden waren, Adeno-NK4 behandelte Mäuse jedoch kleine Ansammlungen hAAT positiver Zellen aufwiesen (Abb. 5.19B). Die Bestimmung des Verhältnisses von Lebergewicht zum Gesamtkörpergewicht zeigte zwischen den Adeno-NK4 und Adeno-LacZ behandelten Gruppen keinen Unterschied (Abb. 5.19D). Die Analysen der Leber-Transaminasen ALT und AST zeigten erhöhte Werte 24 Stunden nach HT die sich zwei und vier Wochen nach HT normalisiert haben. Zwischen Adeno-LacZ und Adeno-NK4 behandelten Mäusen gab es diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5.19C).



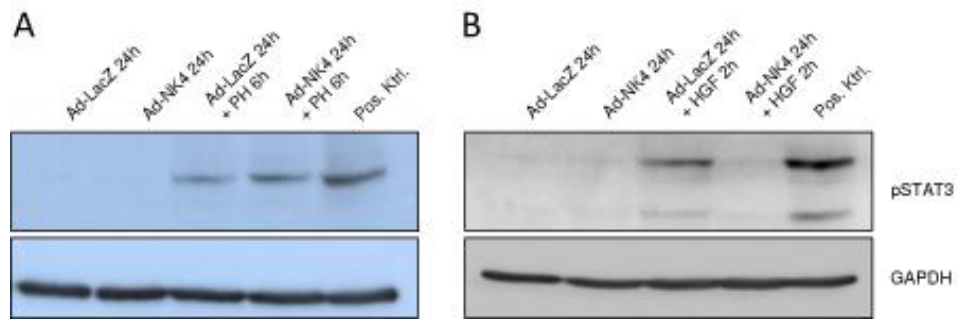
**Abbildung 5.19: Selektion transplantierte Spenderzellen nach c-Met Rezeptor Inhibierung durch Adeno-NK4.**

**A:** Analyse des Serum-hAAT Wertes via ELISA. Als Basis dient der Wert welcher 24 Stunden nach HT gemessen wurde. **B:** Immunfluoreszenzfärbung des Markerproteins hAAT vier Wochen nach HT. **C:** Analyse der Leberaminotransferasen ALT und AST. **D:** Bestimmung des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht zum Zeitpunkt der Organentnahme vier Wochen nach HT.

### **5.7. Effektive Inhibierung c-Met/HGF abhängiger Signalwege**

Im Rahmen der Hepatozytentransplantation zeigte die Adeno-NK4 Behandlung der Empfängermäuse einen positiven Effekt auf die Repopulation durch transplantierte Hepatozyten. Im Weiteren wurde untersucht, wie sich die adenovirale NK4 Expression auf c-Met/HGF abhängige Signalwege auswirkt. Dazu wurden Mäuse mit NK4- und LacZ-exprimierenden Adenoviren infiziert. 24 Stunden später wurde eine partielle Hepatektomie durchgeführt, um die Aktivierung des c-Met/HGF Signalweges zu stimulieren. Die dabei resektierten Leberlappen dienen für weitere Experimente als Kontrollen. Nach sechs weiteren Stunden erfolgte die Organentnahme. Die Analyse der Phosphorylierung c-Met/HGF abhängiger relevanter Proteine zeigte eine gering schwächere Aktivierung von STAT3 in Adeno-NK4 behandelten Mäusen. Die entsprechende Untersuchung in dem resektierten Lebergewebe führte zu keiner Aktivierung entsprechender Signalwege durch die Infektion mit Adenoviren.

Die Stimulation durch partielle Hepatektomie schien für eine relevante Stimulierung des c-Met/HGF Signalweges nicht auszureichen, um einen deutlichen Unterschied zwischen Kontrolltieren und Tieren mit c-Met Rezeptor Inhibierung auszumachen (Abb. 5.20A). Deshalb wurde in folgendem Experiment nicht die PH zur Stimulation angewandt, sondern mittels Injektion von 2 µg rekombinanten murinem HGF (i.p.) der HGF/c-Met Signalweg aktiviert. Die Organentnahme fand 2 Stunden nach HGF Injektion statt. Die proteinbiochemische Analyse der Phosphorylierung c-Met/HGF abhängiger Proteine zeigte in Adeno-NK4 behandelten Mäusen eine deutlich schwächere Phosphorylierung von STAT3, im Vergleich zu Adeno-LacZ behandelten Mäusen und zur c-Met<sup>Δhepa</sup> Positivkontrolle (Abb. 5.20B).



**Abbildung 5.20: Inhibierung HGF/c-Met abhängiger Signaltransduktionswege durch Ad-NK4.**

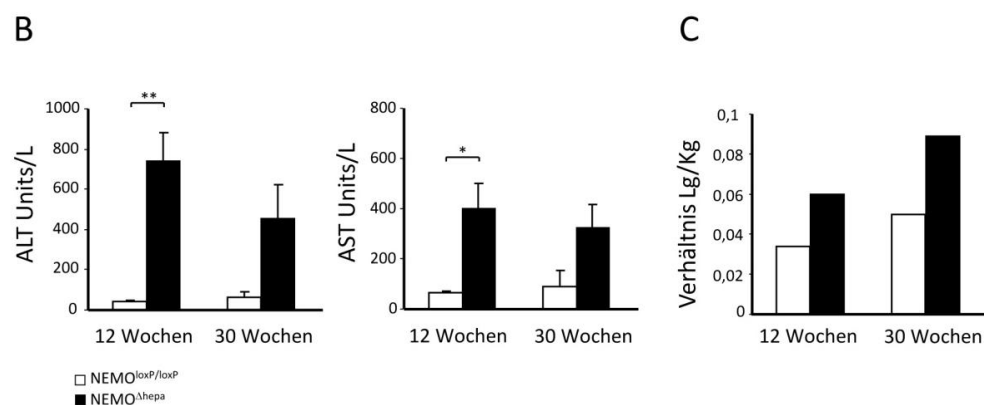
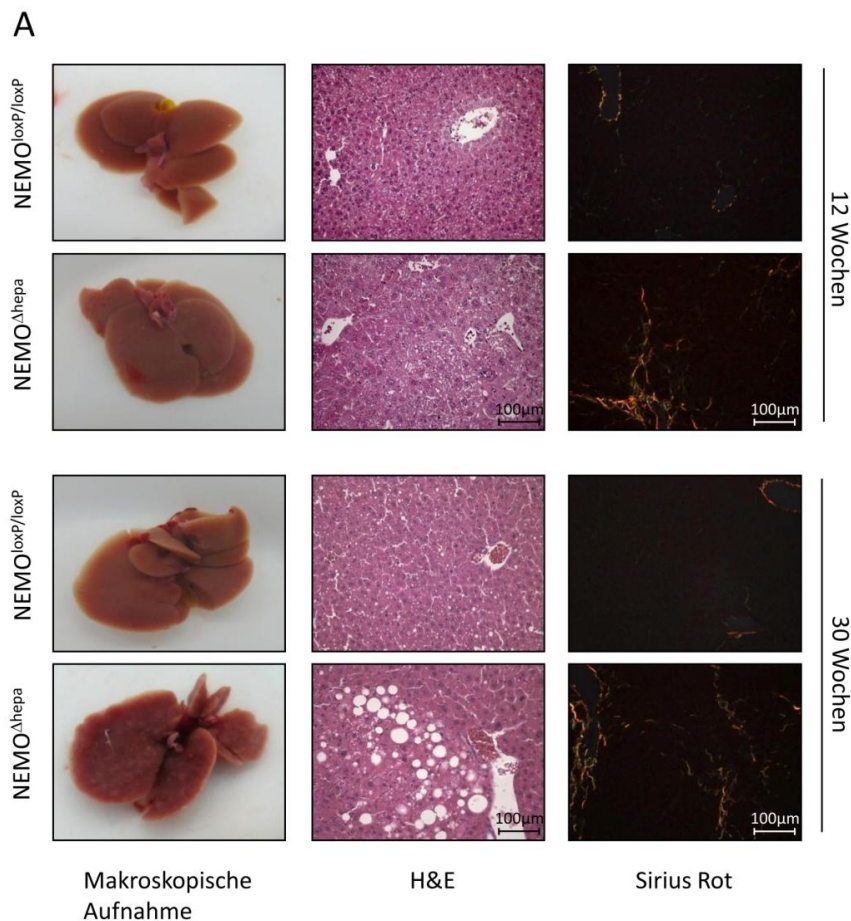
**A:** Wildtyp Mäuse wurden mit Ad-NK4 und Ad-LacZ respektive transfiziert. Nach 24 Stunden wurde eine PH durchgeführt, und nach weiteren 6 Stunden erfolgte die Organentnahme. **B:** Anstelle der PH wurden die Mäuse mit 2µg rekombinantem HGF (ip.) stimuliert. 2 Stunden nach Injektion erfolgte die Organentnahme. Es wurde ein Nachweis des HGF/c-Met abhängigen Proteins STAT3 auf Proteinbasis durchgeführt.

### **5.8. Selektion von Spenderhepatozyten nach HT in NEMO knockout-Mäusen**

Chronische Lebererkrankungen führen in der Regel unumgänglich zu Fibrosierung der Leber. Im den folgenden Experimenten wird die zuvor beschriebene etablierte Methode der Hepatozytentransplantation in einem Mausmodell der spontanen Leberfibrose untersucht. Als Mausmodell dienen konditionale NEMO (NF $\kappa$ B essential modulator) *knockout*-Mäuse. Aufgrund erhöhter Entzündungsreaktionen und erhöhter apoptotischer Aktivität entwickeln diese Mäuse spontan eine Leberfibrose und stellen somit ein fibrotisches Lebermodell dar. Die Transplantationen der Hepatozyten erfolgten wie beschrieben über die Milz. Der Grad der Leberrepopulation wurde über die Analyse des hAAT-Gehaltes im Blut bestimmt. Als Referenzwert wurde hier nicht der gemessene Wert nach 24 Stunden gewählt, sondern 48 Stunden nach HT Blut abgenommen und der Referenzwert hieraus bestimmt. Dies begründet sich auf der Empfindlichkeit der Tiere, welche durch erhöhte Infektionsanfälligkeit eine erhöhte Sterblichkeit nach operativen Eingriffen aufweisen.

Zunächst wurde die Leberschädigung in den NEMO defizienten (NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup>) Mäusen im Alter von 12 und 30 Wochen betrachtet und verglichen. Mit 12 Wochen zeigten NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup> Mäuse bereits makroskopische Veränderung in Form einer unregelmäßigen Leberoberfläche. Histologische Analysen zeigten ebenfalls Unregelmäßigkeiten im Lebergewebe. Die Analyse von Sirius Rot Färbungen zu diesem Zeitpunkt zeigte erhöhte Kollageneinlagerungen in NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup> Mäusen verglichen mit Wildtyp (NEMO<sup>loxP/loxP</sup>) Mäusen in gleichem Alter. NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup> Mäuse wiesen bereits im Alter von 12 Wochen signifikant erhöhte Transaminasen sowie relativ zum Körpergewicht größere Lebern auf. Im Vergleich waren in 30 Wochen alten NEMO <sup>$\Delta$ hepa</sup> Mäusen makroskopisch deutliche Tumoren sichtbar. Histologisch erkannte man eine verstärkte Verfettung der NEMO-defizienten Tiere im Vergleich zu Wildtyp Tieren sowie eine erhöhte Kollagenanreicherung. Die Höhe der Transaminasen nahm im Vergleich zu 12 Wochen alten Tieren leicht ab, die Größe der Lebern im Verhältnis zum Mausgewicht nahm zu (Abb. 5.21).





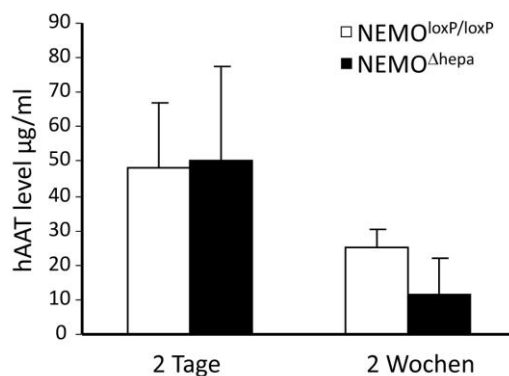
**Abbildung 5.21: Phänotypische Ausprägung der hepatozytenspezifischen Deletion von NEMO in 12 Wochen und 30 Wochen alten Mäusen.**

**A:** Makroskopische Betrachtung der Lebern nach Organentnahme in 12 und 30 Wochen alten Mäusen. Hämatoxylin und Eosin Färbung zur Histologischen Begutachtung. Sirius-Rot Färbung zur Darstellung von Kollageneinlagerungen. **B:** Messung der Lebertransaminasen AST (GOT) und ALT (GPT). **C:** Bestimmung der relativen Lebergröße durch Berechnung des Quotienten von Lebergewicht und Körpergewicht.

Zunächst wurde die Hepatozytentransplantation an  $\text{NEMO}^{\Delta\text{hepa}}$  und  $\text{NEMO}^{\text{loxP/loxP}}$  Empfängertieren durchgeführt, welche bereits ein Alter von 30 Wochen erreicht hatten. Es sollte entschieden werden ob die in Abb. 5.21 beschriebene Leberschädigung in diesem Alter einen ausreichenden Selektionsdruck auf transplantierte Spenderhepatozyten ausübt.

Da konditionale *NEMO knockout*-Mäuse zu erhöhter Apoptose neigen, besteht die Möglichkeit, dass Spenderzellen nach Transplantation durch Apoptose zugrunde gehen. Um den Repopulationserfolg durch Apoptose der Spenderzellen nicht zu gefährden, bzw. um zu untersuchen, inwieweit die Apoptose in den Spenderzellen den Repopulationserfolg beeinträchtigt, wurden Spenderzellen verwendet, welche aus Apoptose-resistenten Mäusen stammen. Dies sind Mäuse mit einem hepatozytenspezifischen konditionalen *knockout* für Caspase-8 ( $\text{Casp8}^{\Delta\text{hepa}}$ ). Fehlt das Protein Caspase-8, so kann die Caspase-Signalkaskade nicht in Gang gesetzt werden, welche zum programmierten Zelltod führt. So dienten  $\text{Casp8}^{\text{loxP/loxP}}/\text{hAAT}(+)$  sowie  $\text{Casp8}^{\Delta\text{hepa}}/\text{hAAT}(+)$  Mäuse als Spendertiere.

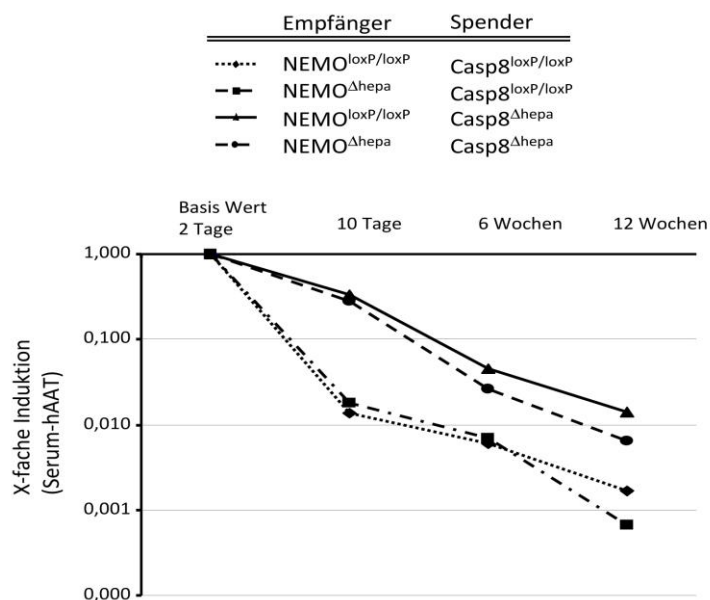
In diesem Experiment erfolgte die Transplantation mit hAAT positiven transgenen Caspase8 Wildtyp Mäusen ( $\text{Casp8}^{\text{loxP/loxP}}/\text{hAAT}(+)$ ), ohne jegliche Vorbehandlung der 30 Wochen alten Empfängertiere. Es zeigte sich, dass bereits 14 Tage nach HT die Serum-hAAT Werte unter den Ausgangswert, welcher 48 Stunden nach HT gemessen wurde, abgesunken waren (Abb. 5.22).



**Abbildung 5.22: Hepatozytentransplantation in alte (30 Wochen) Mäuse**

Transplantation von hAAT transgenen Spenderzellen in unvorbehandelte  $\text{NEMO}^{\text{loxP/loxP}}$  und  $\text{NEMO}^{\Delta\text{hepa}}$  Empfängermäuse. Die Bestimmung des hAAT Serum Wertes nach 2 Wochen ergab bereits sinkende Werte, so dass keine Repopulation mehr zu erwarten war.

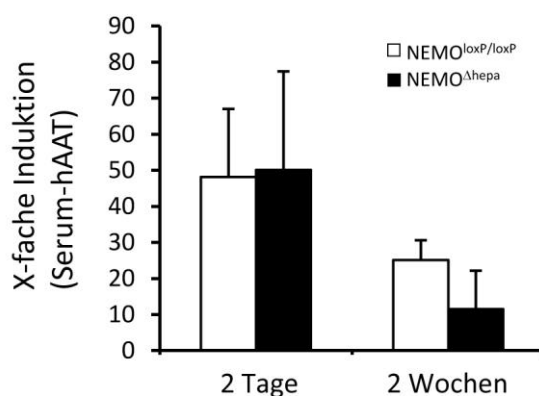
Aufgrund der fehlenden Repopulation nach HT in älteren Tieren wurden im nächsten Experiment unvorbehandelte Empfängertiere im Alter von zwölf Wochen verwendet, da bereits im Alter von zehn Wochen makroskopisch erste fibrotische Veränderungen in den Lebern der NEMO<sup>Δhepa</sup> Mäuse festzustellen sind. Die Messung des Serum-hAAT Gehalts zwölf Wochen nach HT zeigte einen Abfall dieses Wertes unter den bei 48 Stunden nach HT gemessenen Ausgangswert. Dabei zeigte sich, dass Empfängertiere, die mit Casp8<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+) Spenderzellen transplantiert wurden, einen weniger starken Abfall der Serum-hAAT Werte erkennen ließen (Abb. 5.23).



**Abbildung 5.23: Hepatozytentransplantation in naïve NEMO Mäuse.**

Die Transplantation von sowohl Casp8<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+), als auch von Casp8<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+) Spendertieren resultierte 12 Wochen nach HT in einem Abfall der Serum-hAAT Werte unter den gemessenen Ausgangswert.

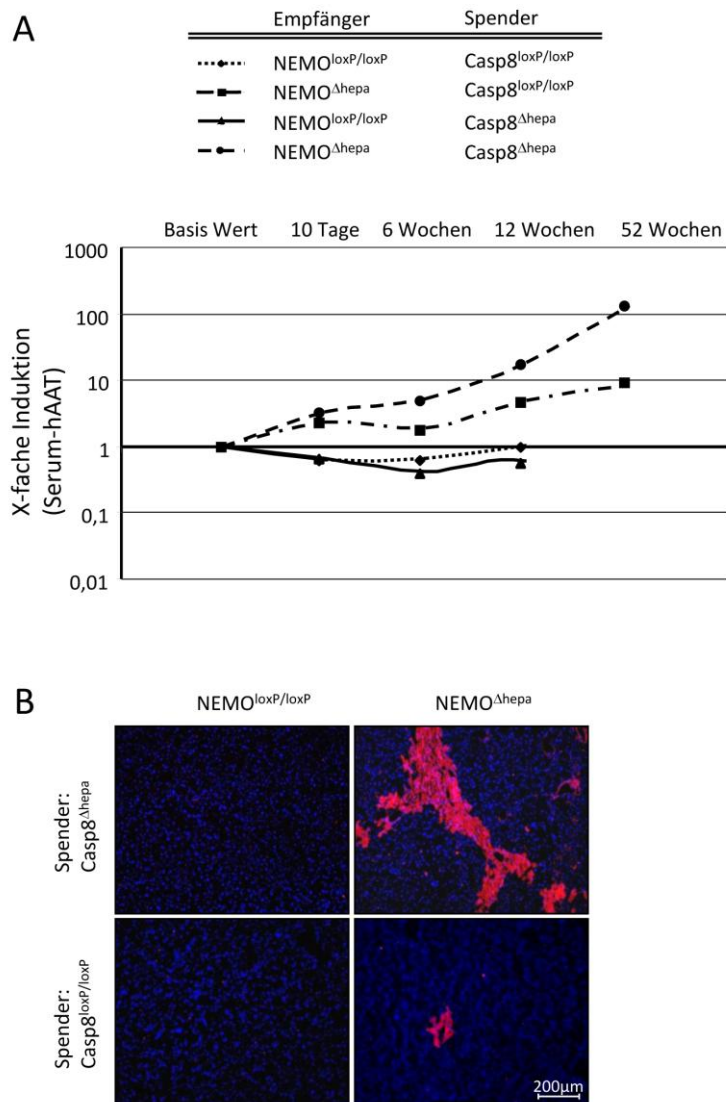
Die bisherigen Transplantationsergebnisse in NEMO *knockout*-Mäusen konnten keine Repopulation durch Spenderzellen erkennen lassen. Deshalb wurde im nächsten Schritt der Selektionsdruck auf die transplantierten Zellen erhöht. Durch Bestrahlung des Abdomens der Empfängertiere mit einer Dosis von 12 Gray wurde der Leber eine zusätzliche Schädigung zugefügt. Residente Hepatozyten sollten dadurch soweit geschädigt sein, dass ihnen eine Proliferation nicht mehr möglich ist. Durch Abschirmung der Extremitäten und des Thorax, war es möglich nur den abdominalen Bereich der Maus zu bestrahlen. Dazu wurden die Mäuse zum Fixieren in eine leichte Narkose gelegt. Da die Extremitäten von der Bestrahlung ausgeschlossen wurden, ist es nicht nötig eine Knochenmarktransplantation durchzuführen. Als Spendertiere wurden Casp8<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+) verwendet. Die Analyse des Serum-hAAT Wertes zwölf Wochen nach HT ergab erneut abfallende Werte im Vergleich zum Referenzwert (Abb. 5.24). Da durch die Transplantation von Casp8<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+) Spenderzellen kein gegenteiliges Ergebnis erwartet wurde, wurde dieses Experiment nicht durchgeführt.



**Abbildung 5.24: HT in Empfängermäuse, welche einer abdominalen Bestrahlung ausgesetzt waren.**

Die Empfängertiere wurden unter Narkose nur im abdominalen Bereich bestrahlt. Es erfolgte keine KMT. Die HT mit Casp8<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+) Spenderzellen führte nicht zur erwarteten Repopulation.

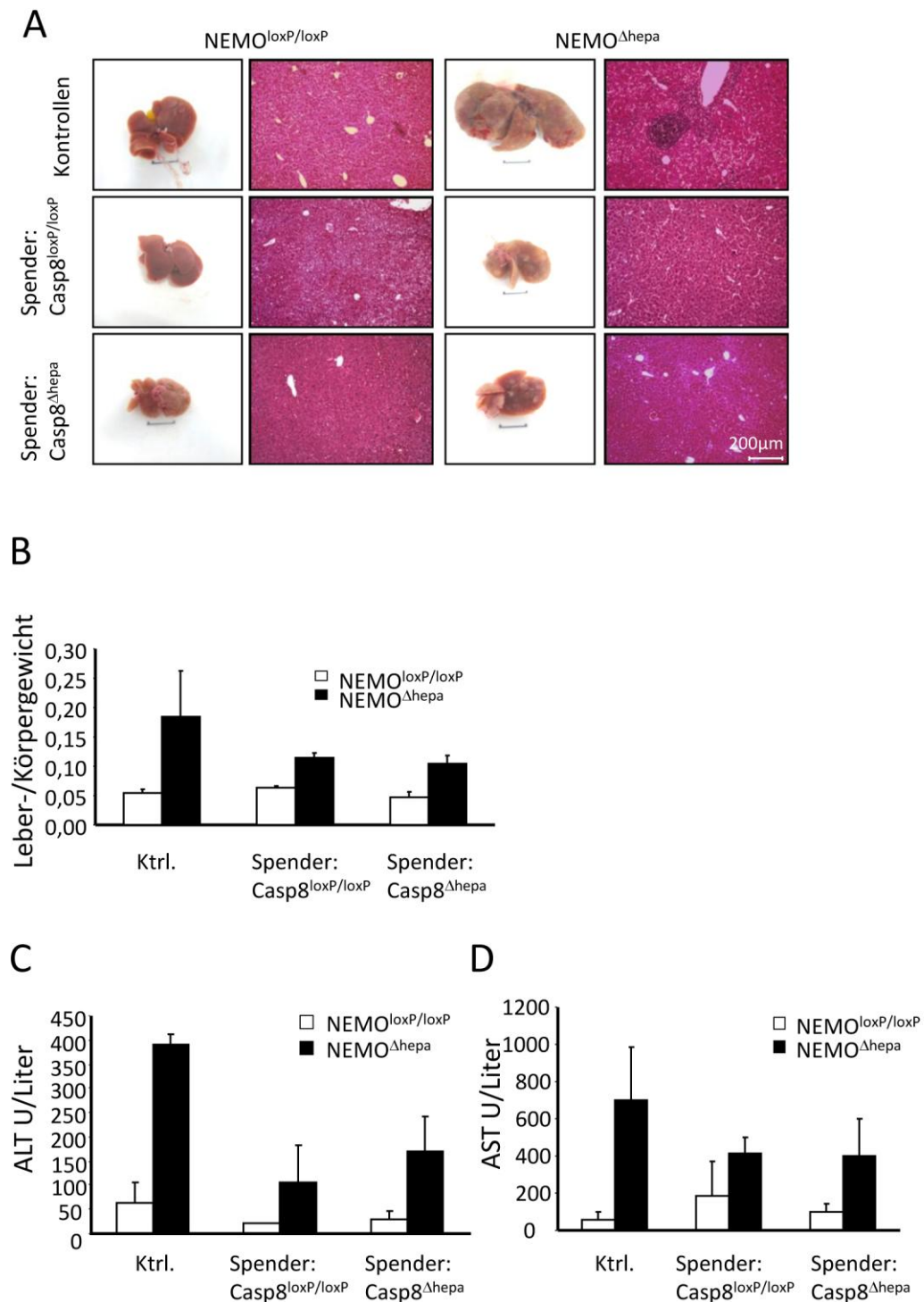
Wie bereits gezeigt werden konnte hat die Knochenmarkstransplantation eine fördernde Wirkung auf die positive Selektion von Spenderhepatozyten nach HT. Dies führte zu dem Experiment, NEMO Mäuse einer Bestrahlung mit anschließender Knochenmarkstransplantation zu unterziehen. Vier Wochen nach dieser Vorbehandlung fand die HT statt. Als Spendertiere dienten  $\text{Casp8}^{\text{loxP/loxP}}/\text{hAAT}(+)$  sowie  $\text{Casp8}^{\Delta\text{hepa}}/\text{hAAT}(+)$  Mäuse. Die Transplantation in  $\text{NEMO}^{\text{loxP/loxP}}$  Empfängertiere resultierte sowohl mit  $\text{Casp8}^{\text{loxP/loxP}}/\text{hAAT}(+)$ , als auch mit  $\text{Casp8}^{\Delta\text{hepa}}/\text{hAAT}(+)$  Spenderhepatozyten in einem Abfall der Serum-hAAT Werte unter den Ausgangswert.  $\text{NEMO}^{\Delta\text{hepa}}$  Empfängermäuse hingegen zeigten einen signifikanten Anstieg des Serum-hAAT Wertes zwölf Wochen nach HT. Hierbei zeigte sich auch erstmals ein signifikanter Unterschied zwischen den Spendergruppen. Mäuse, welche mit den apoptoseresistenten  $\text{Casp8}^{\Delta\text{hepa}}/\text{hAAT}(+)$  Hepatozyten transplantiert wurden, wiesen einen signifikant höheren Gehalt an hAAT im Blut auf, verglichen mit Mäusen, deren Spenderzellen aus  $\text{Casp8}^{\text{loxP/loxP}}/\text{hAAT}(+)$  Spendern stammte (Abb. 5.25A). Dies ließ sich anhand einer Immunfluoreszenzfärbung des Markerproteins hAAT verifizieren (Abb. 5.25B).



**Abbildung 5.25: Eine vorangegangene Bestrahlung der Empfängertiere vor der HT führt zu Repopulation in NEMO-defizienten Mäusen.**

**A:** Die Messung der Serum-hAAT Werte nach HT via ELISA zeigen erhöhte Werte in NEMO<sup>Δhepa</sup> Empfängertieren, ein Effekt der durch die Verwendung von Caspase-resistenten Spenderzellen weiter verstärkt wird. **B:** Immunfluoreszenzfärbungen 52 Wochen nach HT verdeutlichen die Differenz in der Repopulationseffektivität von Caspase<sup>loxP/loxP</sup> Zellen zu Caspase<sup>Δhepa</sup> Zellen (rot: hAAT(+) Zellen; blau: Dapi).

Im nächsten Schritt wurden weitere Untersuchungen zu Leberfunktion sowie zu histologischen Veränderungen nach der HT unternommen. Bei der Organentnahme fiel auf, dass Lebern transplanteder Mäuse wesentlich kleiner waren als Lebern untransplanteder Mäuse (Abb. 5.26A). Histologisch wiesen transplantede Tiere 52 Wochen nach HT weniger infiltrierende Zellen auf, als untransplantede Tiere gleichen Alters. Die Auswertung des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht festigte diese den Eindruck von geringerer Größe der transplanteden Lebern (Abb. 5.26B). Auch die Werte der Lebertransaminasen waren 52 Wochen nach HT im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen deutlich zurück gegangen (Abb. 5.26C; D).



**Abbildung 5.26: HT in NEMO-defizienten Mäusen führt auf Dauer zu verbesserter Leberfunktion.**

**A:** Makroskopische und histologische Betrachtung von transplantierten (Casp8<sup>loxP/loxP</sup>/hAAT(+)) und Casp8<sup>Δhepa</sup>/hAAT(+) Spenderzellen) im Vergleich zu gleichaltrigen behandelten Lebern. **B:** Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht bestätigt den Eindruck von geringerer Lebermasse in transplantierten Mäusen. **C, D:** Transplantierte Tiere zeigen niedrigere Transaminasen.



## 6. Diskussion

### 6.1. *c-Met abhängige Repopulation nach Hepatozytentransplantation*

Eine Reihe metabolischer, viraler oder toxisch-medikamentös-induzierter Erkrankungen führen zu akuter oder chronischer Leberschädigung. Bei fulminanten Verläufen und terminalen Fibrosen ist eine Lebertransplantation die einzige kurative therapeutische Maßnahme. Aufgrund geringer Organspenderzahlen besteht ein immenser Mangel an Spenderlebern, wodurch sich die Wartezeiten der Patienten verlängern und die Mortalität steigt. Deshalb ist es ein wichtiger und wachsender Bereich der Forschung alternative Therapiemöglichkeiten zur Lebend-Vollorgantransplantation zu etablieren.

Über die Regenerationsfähigkeit der Leber nach mechanischer Schädigung berichtet bereits die Prometheus-Sage (Bulfinch's Mythology). Dieses Regenerationspotential der Leberzellen wird bei der Entwicklung von Methoden mit denen man Lebend-Organtransplantationen umgehen kann, und somit dem Mangel an Spenderlebern entgegentreten kann, versucht zu Nutzen. Die Transplantation isolierter Hepatozyten aus einer Spenderleber verteilt auf mehrere Empfänger stellt dabei einen vielversprechenden Ansatzpunkt dar. Ziel dabei ist, dass die transplantierten Spenderzellen in der Empfängerleber anwachsen und durch ihr hohes Regenerationspotential diese funktionsfähig repopulieren. Die Vorteile dieser Methode liegen zum Einen in der Verteilung der Zellen von einem Spender auf mehrere Empfänger, wodurch die Problematik des Spendermangels gelöst werden könnte. Zum Anderen ist die Transplantation isolierter Spenderzellen ein weniger invasiver Eingriff als die Transplantation eines ganzen Organs. Weiterhin lassen sich isolierte Zellen im Gegensatz zu ganzen Organen problemlos kryokonservieren und zu späteren Zeitpunkten verwenden (Moshage et al. 1988). Nachteile sind auch hier die notwendige Immunsuppression des Empfängers sowie die Tatsache, dass sich nur eine bestimmte Menge an Zellen in einem Eingriff transplantieren lassen. Da die Transplantation über das venöse Pfortadersystem und nicht direkt in das Leberparenchym erfolgt, kann es bei einer zu hohen Zelldichte zu thromboembolischen Komplikationen kommen. Prinzipiell ist eine mehrfache Wiederholung der Hepatozytentransplantation möglich, dennoch ist es mit einer geringeren Belastung für den Patienten und letztlich auch mit geringeren Kosten verbunden, wenn die transplantierten

Zellen *in vivo* zu erhöhter Repopulation angeregt werden und weitere Eingriffe unnötig machen.

Weitere Ansätze zur Etablierung alternativer Therapiemethoden sind die Transplantation von Stammzellen welche sich *in vitro* (Basma et al. 2009), oder *in vivo* zu Hepatozyten differenzieren (Moriya et al. 2007). Zahlreiche Studien beschäftigen sich im Maus- oder Rattenmodell mit den zugrundeliegenden Mechanismen der Repopulation nach Hepatozytentransplantation, um Grundlagen zu geben eben diese *in vivo* Repopulation zu erhöhen. Ziel dieser Studie ist es aufzuklären inwieweit der Wachstumsfaktor HGF (*hepatocyte growth factor*) und sein Rezeptor c-Met Einfluss auf den Repopulationserfolg im Maus-Modell nach Hepatozyten-Transplantation nehmen.

Die Bindung von HGF als einzigen Liganden an c-Met führt zu dessen Phosphorylierung wodurch verschiedenste intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt werden (Weidner et al. 1996). Die Auswirkungen dieser durch c-Met aktivierten Signalwege sind vielfältig. So wurde gezeigt, dass HGF/c-Met angiogenetische, morphogenetische und mito- und motogenetische Zellfunktionen steuern kann. Außerdem üben sie anti-apoptotische Wirkungen aus. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass die c-Met Aktivierung zu einem Schutz der Hepatozyten sowohl bei akuter als auch bei chronischer Leberschädigung führt (Huh et al. 2004; Giebeler et al. 2009).

In dem hier angewandten Mausmodell werden den Empfängermausen jeweils  $1 \times 10^6$  unmittelbar vorher isolierte Hepatozyten in den oberen Milzpol injiziert. Es konnte gezeigt werden, dass selbst Zellen, welche aus bereits 24 Stunden toten Tieren isoliert wurden, eine vergleichbare Lebensfähigkeit besitzen wie frisch isolierte Zellen (Erker et al. 2010). Andere Studien zeigen, dass vor allem das Alter der Spender ausschlaggebend für die Qualität der Spenderzellen ist (Kawahara et al. 2010). Die Zellen migrieren über die Pfortader in die Lebersinusoide, übertreten dort das Endothelium und siedeln sich im Leberparenchym an. Um dort eine durch die transplantierten Leberzellen induzierte Regeneration der Leber zu erreichen ist es notwendig, die Empfängerlebern zuvor zu konditionieren. Dazu wird ein bereits etabliertes Protokoll bestehend aus Bestrahlung mit anschließender Knochenmarkstransplantation, der Gabe des Proliferationshemmers Retrorsine sowie der Durchführung einer 2/3 Leberresektion als Proliferationsstimulus angewandt (Tschaharganeh et al. 2010). Die Kombination aus leberschädigenden (Bestrahlung, Retrorsine) und proliferationsstimulierenden Eingriffen (partielle Hepatektomie)

gewährleistet einen Selektionsvorteil für transplantierte Spenderzellen gegenüber den residenten Hepatozyten (Igarashi et al. 2008).

Die nach vorangegangenen Konditionierungen der Empfängermäuse durchgeführte Hepatozytentransplantation erfolgt zunächst mit hAAT (humanes  $\alpha$ 1-Antitrypsin) transgenen Wildtyp Spenderzellen in ebenfalls Wildtyp Mäuse eines FVB Mausstammes. Anhand des Serum-hAAT Wertes lässt sich das Anwachsen der Spenderzellen beurteilen, welcher bereits in den ersten drei Tagen signifikant ansteigt (Abb. 5.2A). Hepatozytentransplantationen in Ratten zeigten zwei Stunden nach HT, dass 55% der transplantierten Zellen in der Leber angekommen sind, 15% sich in der Milz befinden und auch Lunge (3%) und Pankreas (1%) transplantierte Zellen aufweisen (Gupta et al. 1991, 1995). Unsere Untersuchungen von Leber, Lunge, Milz und Niere zeigen vergleichbare Ergebnisse. Zwei Stunden nach HT befindet sich noch eine deutliche Ansammlung an Spenderzellen in der Milz, welche mit fortschreitender Zeit nach HT deutlich abnimmt, wohingegen die Anzahl transplanterter Zellen in der Leber zunimmt. In Niere und auch in der Lunge bleibt die Färbung hingegen negativ. Mit diesem sogenannten „homing“ in der Leber sind die ersten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Repopulation der selben geschaffen (Abb. 5.2B).

Der primäre Transplantationsversuch c-Met <sup>$\Delta$ hepa</sup>/hAAT(+) Spenderzellen in konditionierte Empfängertiere zu injizieren zeigt keine Repopulation. Dabei macht es keinen Unterschied, ob c-Met<sup>loxP/loxP</sup> oder c-Met <sup>$\Delta$ hepa</sup> Empfängertiere verwendet werden. Diese Daten legen die essentielle Rolle des HGF/c-Met Signalweges für die Leberregeneration dar. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass im Falle der Transplantation von c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Spenderzellen in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertiere eine Repopulation stattfindet. Erstaunlicherweise repopulieren c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Spenderzellen in c-Met defizienten Empfängermäusen etwa 10 Mal stärker, als in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängertieren (Abb. 5.3). Da bei der partiellen Hepatektomie etwa 70 % des vorhandenen Lebergewebes entfernt wird, wird der Repopulationserfolg weiter dadurch verdeutlicht, dass man 12 Wochen nach HT nachweisen kann, dass mehr als 50 % des Gesamtlebergewebes von transplantierten Spenderzellen eingenommen wird (Abb. 5.4). Dieser Effekt lässt darauf schließen, dass es durch das Fehlen des c-Met Rezeptors in den Empfängertieren nach den Vorbehandlungen zu einer reduzierten Gewebsregeneration kommt. Dadurch erfahren transplantierte Hepatozyten einen Selektionsvorteil gegenüber residenten Zellen.

Die hier beobachtete extreme Repopulation durch Spenderzellen ist auf die Vorschädigung durch Bestrahlung, Knochenmarkstransplantation (KMT), der Gabe von Retrorsine sowie der 70%-igen Hepatektomie zurückzuführen. Verschiedene Variationen des Vorbehandlungsprotokolls, bis hin zur HT in unbehandelte, naïve Empfängermäuse zeigen einen additiven Effekt auf den Repopulationserfolg (Abb. 5.5). Alleine das Fehlen des c-Met Rezeptors in den Empfängern ohne jede Konditionierung führt zwölf Wochen nach HT zu einem signifikanten Anstieg der Serum-hAAT Werte verglichen mit c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängern (Abb. 5.4C). Das zeigt, dass Spenderzellen durch die Schädigung der Empfängerlebern zwar einen gewissen Selektionsvorteil genießen, wobei dieser jedoch zu einer vollständigen Repopulation nicht ausreicht, da die annähernd vollständige Repopulation nur in c-Met defizienten Empfängertieren beobachtet werden kann. In Versuchen zur Stammzelltransplantation in Retrorsine behandelten und hepatektomierten Ratten, konnte diese substanzielle Bedeutung des Rezeptors c-Met bereits gezeigt werden. Neun Monate nach der Transplantation zeigten Ratten welche mit fetalen c-Met<sup>+</sup> Stammzellen transplantiert wurden funktionsfähiges neues Gewebe; c-Met defiziente fetale Stammzellen repopulieren nicht in der geschädigten Leber (Suzuki et al. 2004).

Durch den Vergleich der Absolutwerte von hAAT im Serum 24 Stunden nach HT zeigt sich, dass eine erhöhte Repopulation in c-Met defizienten Mäusen nicht auf ein verstärktes Anwachsen der Spenderzellen gleich nach der HT zurückzuführen ist. Die Serum-hAAT Werte sind nahezu identisch. Vielmehr werden c-Met abhängige Mechanismen Grundlage für einen dauerhaften positiven Selektionsdruck in Spenderzellen sein.

Die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen führt zunächst zur Analyse der proliferativen Aktivität. Vier Wochen nach Hepatozytentransplantation zeigen die Empfängermäuse die höchste Proliferation, wobei c-Met defiziente Empfänger signifikant mehr proliferieren (Abb. 5.6A, B). Durch detailliertere Analysen stellt sich heraus, dass vorwiegend Spenderzellen proliferieren, welche in c-Met-defiziente Empfänger transplantiert wurden (Abb. 5.7A, B). Diese führt dann zu der beobachteten erhöhten Repopulation schon wenige Wochen nach HT. Die abnehmende proliferative Aktivität zwölf Wochen nach HT ist auf die bereits sehr weit durchgeführte und möglicherweise bald abgeschlossene Repopulation zurückzuführen. Da c-Met als wichtiger Faktor für Proliferation bekannt ist (Potempa et al. 1998; Borowiak et al. 2004) ist diese der Grund für die ausbleibende Repopulation durch c-Met defiziente Spenderzellen. Weitere Analysen zur

Identifikation des proliferierenden Zelltyps ergeben 48 Stunden nach HT vorwiegend kleinere proliferierende Zelltypen, wohingegen 12 Wochen nach HT eindeutig nur Hepatozyten proliferieren (Abb. 5.7C, D). Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Ratten nach PH und Retrorsine-Behandlung eine Art kleinerer Hepatozyten-Vorläuferzellen für die Leberrekonstruktion verantwortlich ist (Gordon et al. 2000). Anhand unserer Daten kann allerdings nicht zwischen „small hepatocytes“ und anderen nicht-parenchymatösen Zellen differenziert werden.

HGF/c-Met abhängige Signalwege sind bekannt dafür, anti-apoptotische Eigenschaften zu steuern (Bardelli et al. 1996). Die Untersuchung der apoptotischen Aktivität ergibt erhöhte Apoptose-Werte vier Wochen nach HT in den c-Met defizienten Mäusen (Abb. 5.8A, B). Auch hier werden Lokalisationsanalysen durchgeführt, welche eine erhöhte apoptotische Aktivität im Bereich des Empfängergewebes aufweisen (Abb. 5.8C). Die apoptotische Aktivität wird auch durch die Bestrahlung ausgelöst, dennoch schien durch die erhöhte Repopulation in unbehandelten Mäusen ebenfalls das Fehlen des c-Met Rezeptors einen nicht unwesentlichen Beitrag zu leisten. Dadurch wird im Leberparenchym physisch Platz geschaffen, welcher von proliferierenden Spenderzellen ausgenutzt wird. Dieser Effekt des Zellaustauschs, welcher in der gesunden Leber zur ständigen Regeneration beiträgt (Duncan et al. 2009) scheint demnach auch vom c-Met Rezeptor abhängig zu sein, und wurde auch an Hepatozyten-transplantierten Lebern gezeigt (Ding et al. 2011). Eine Theorie, die unter dem Namen „Streaming Theory“ bekannt wurde, beschreibt den Zellwettbewerb bei der Gewebsregeneration mit erhöhter Gewebsrekonstruktion, welche zunächst in der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gezeigt wurde (Oertel et al. 2006).

Neben einer unausgeglichene Proliferations-Apoptose Balance spielen auch Veränderung der Gewebsstruktur eine wesentliche Rolle für die Repopulation transplantierte Hepatozyten. Histologische Untersuchungen des Gewebes nach HT zeigen keinerlei Auffälligkeiten (Abb. 5.9A). Die Untersuchung von Sirius-Rot gefärbten Geweben nach HT sowie zum Zeitpunkt der Hepatektomie (Ktrl.  $t_0$ ) lassen deutliche Unterschiede in der Färbintensität erkennen. Die Kontrollgruppe welche einer Knochenmarkstransplantation sowie einer Retrorsine-Behandlung unterzogen war zeigt eine erhöhte Sirius-Rot Färbung. Dieser Effekt kann durch partielle Hepatektomie mit anschließender Hepatozytentransplantation aufgehoben werden (Abb. 5.9B). Die Leberenzyme ALT und AST

steigen 2 Tage nach HT um das 5-fache (ALT) bzw. um das Doppelte (AST) an. ALT-Werte haben sich vier Wochen nach HT bereits wieder normalisiert (Abb. 5.9C, D).

Darauf folgend wurde die Aktivierung von extrazellulärer Matrix produzierenden Sternzellen untersucht. Dabei zeigt sich eine erhöhte Anzahl aktivierter Sternzellen erst zwölf Wochen nach HT in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen (Abb. 5.10A, B). Im Kontrast dazu zeigt sich vier Wochen nach HT eine signifikante Erhöhung der Collagen 1-α Akkumulation in c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen (Abb. 5.11A, B), ein Ergebnis welches durch entsprechende Ergebnisse auf mRNA Ebene in einer quantitativen PCR verifizieren lässt (Abb. 5.11C). Bereits zwölf Wochen nach HT sind die Werte der Collagen 1-α Expression wieder auf mit Kontrolltieren vergleichbare Werte gesunken. Diese Daten legen nahe, dass es durch die Konditionierung und Transplantation nur zu temporären Umbauvorgängen und nicht zur dauerhaft anhaltenden fibrotischen Leberschädigung kommt. Die nähere Analyse der Lokalisation ergibt, dass besonders in Bereichen des Empfängergewebes mehr Collagen 1-α nachweisbar ist (Abb. 5.12A, B). Diese Analyse zeigt erneut, dass Umstrukturierungen in extrazellulärer Matrix einen erheblichen Einfluss auf die Repopulation transplantierte Hepatozyten haben, wie sie auch bereits in der Ratte beschrieben wurden (Kumaran et al. 2005).

Eine Reihe c-Met abhängiger Gene spielen eine entscheidende Rolle in Bezug auf Proliferation, Apoptose und somit in Bezug auf die Regeneration nach Hepatozytentransplantation. Die Analyse der mRNA Expression von HGF zeigt einen Anstieg 48 Stunden nach HT, der jedoch nur vorübergehend ist; bereits vier Wochen nach HT hat sich der Wert bereits normalisiert, bzw. liegt tendenziell unter der normalen Expressionsrate (Abb. 5.13). Das legt nahe, dass die transkriptionelle Regulation von HGF keine essentielle Rolle für die anhaltende Selektion spielt. Auf proteinbiochemischer Ebene zeigt sich eine starke Phosphorylierung von AKT 48 Stunden nach HT, dabei fällt die AKT Aktivierung in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfängerermäusen deutlich stärker aus, verglichen mit c-Met<sup>Δhepa</sup> Empfängerermäusen (Abb. 5.14). Dies entspricht den Analysen, welche bereits 1996 zeigten, dass der PI3-Kinase/AKT Signalweg HGF/c-Met vermittelt aktiviert werden kann (Ponzetto et al. 1996). Der Transkriptionsfaktor STAT3, welcher ebenfalls bekannt ist anti-apoptotische und pro-proliferative Funktionen auszuüben (Haga et al. 2003; Dierssen et al. 2008), zeigt 48 Stunden nach HT ebenfalls eine deutliche Aktivierung in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Mäusen (Abb. 5.14). Die ausbleibende bzw. deutlich geringere Aktivierung dieser HGF/c-Met abhängigen Gene in

c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen legt nahe, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen sowohl AKT als auch STAT3 zu einem relevanten Teil mit über c-Met reguliert werden. Da Zellproliferation unter anderem von der Aktivierung der Kinase AKT und des Transkriptionsfaktors STAT-3 abhängig ist, liegt hier wahrscheinlich ein Mechanismus vor, der in c-Met defizienten Mäusen relevant gestört ist. Dadurch erfahren transplantierte Hepatozyten einen deutlich stärkeren Selektionsvorteil als in c-Met<sup>loxP/loxP</sup> Empfänger-Mäusen, deren Regenerationspotential nicht beeinträchtigt ist.

Im Rahmen der Analysen von Faktoren des Immunsystems in der Leber nach HT zeigt sich eine signifikante Erhöhung von CD11b positiven Zellen 48 Stunden nach HT (Abb. 5.15). Durch den operativen Eingriff bei der Transplantation ist ein Anstieg von Immunzellen kurz nach der Operation nicht ungewöhnlich, da sich aufgrund von „nicht-humanen Operationsstandards“ minimale Entzündungen an der Operationswunde ergeben können. Es ist auch möglich, dass der Reiz der transplantierten residenten Zellen eine aseptische Entzündungsreaktion in der Leber mit auslöst. Auf eine Verbesserung der Werte nach vier Wochen folgt interessanterweise ein Anstieg in den c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen (Abb. 5.15). Eine weitere Analyse von CD4 positiven T-Lymphozyten bestätigte dieses Ergebnis durch ebenfalls erhöhte Werte zum zwölf Wochen Zeitpunkt in c-Met<sup>Δhepa</sup> Mäusen (Abb. 5.16). Der Einfluss CD4 positiver Zellen auf die Zellselektion konnte bereits gezeigt werden (Streetz et al. 2008). Die Analyse der Makrophagen Infiltration als Folge der Hepatozytentransplantation zeigt zunächst eine geringere Anzahl an Makrophagen in der Leber. Dabei gibt es in c-Met defizienten Mäusen zunächst signifikant weniger F4/80 positive Zellen. Diese Beobachtung wird gestützt durch Studien, welche belegen, dass die Depletion von Kupffer Zellen zu verstärkter Repopulation nach HT führten (Krohn et al. 2009). Zwölf Wochen nach HT hat sich die Menge an Makrophagen wieder normalisiert (Abb. 5.17). Detaillierte Analysen zeigen, dass besonders die Bereiche, die aus transplantierten Spenderzellen hervorgegangen sind, erheblich mehr F4/80 positive Makrophagen aufweisen (Abb. 5.18).

Offensichtlich ist die Proliferation von Immunzellen im verwendeten Modell in unterschiedlichem Maße beeinträchtigt. Es kann von den vorliegenden Daten nicht angenommen werden, dass sie bei der Repopulation von Hepatozyten eine weiterreichende Rolle spielen.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Daten schließen, dass der Rezeptor c-Met eine essentielle Rolle für die Zellselektion nach HT spielt, und diese grundlegend fördert.

Daraus ergeben sich neue Ansatzpunkte, die *in vivo* Repopulation durch therapeutische Interventionen im HGF/c-Met Signalweg weiter zu verbessern.

## **6.2. Inhibierung des c-Met Rezeptors führt zu positiver Zellselektion**

Durch einen konditionalen hepatozytenspezifischen *knockout* kann also eine positive und effektive Selektion transplanteder Hepatozyten nach HT erreicht werden. Dadurch stellt c-Met einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Strategien dar, die die *in vivo* Repopulation transplanteder Hepatozyten begünstigen. In dieser Arbeit wird aufgrund dieser Erkenntnis nun ein weiterer Schritt im Bereich der experimentellen therapeutischen Anwendung unternommen. Im Rahmen des Hepatozytentransplantationsmodells wird der Rezeptor c-Met durch die Gabe eines HGF-Antagonisten inhibiert. Dies entspricht quasi einem funktionellen *knockout*. Die Inhibierung erfolgt durch die adenovirale Überexpression des HGF-Antagonisten NK4 (Adeno-NK4). NK4 bindet kompetitiv an c-Met, ohne jedoch seine Phosphorylierung auszulösen. NK4 hat seine effektive inhibitorische Wirksamkeit im Bereich der Angiogenese und Proliferation besonders im Rahmen der Tumorforschung sowohl *in vitro* (Jiang et al. 1999; Kuba et al. 2000), als auch *in vivo* (Kubota et al. 2009; Nakamura et al. 2010; Saimura et al. 2002; Maemondo et al. 2002) eindrucksvoll bewiesen.

In unseren Studien werden Mäuse mit dem NK4-exprimierenden Adenovirus, bzw. einem LacZ-exprimierenden Adenovirus, transfiziert und anschließend Hepatozytentransplantiert. Adeno-NK4 behandelte Mäuse zeigen signifikant mehr Repopulation nach Hepatozytentransplantation (Abb. 5.19A, B). Die 4 Wochen nach HT gemessenen SerumhAAT Werte der Adeno-NK4 behandelten Mäuse sind vergleichbar mit denen welche in c-Met defizienten Mäusen 4 Wochen nach HT gemessen werden. Dies zeigt, dass NK4 c-Met funktionell und effektiv inhibiert. Die experimentelle Inhibition der HGF/c-Met Wirkung kann Grundlage sein für die Entwicklung von Therapieansätzen im Rahmen von Hepatozytentransplantationen. Um diese für den Patienten erfolgreich und mit möglichst wenigen operativen Eingriffen gestalten zu können, kann die Inhibierung von c-Met für eine kurze Dauer vor der Zelltransplantation zu einer verstärkten *in vivo* Repopulation der Spenderzellen führen. Dabei ist zu beachten, dass eine Adenovirus-basierte Therapie an Patienten nicht unproblematisch ist. Auch wenn die in der Gentherapie verwendeten



adenoviralen Vektoren durch die Deletion der Gene E1A und E1B nicht mehr zur Replikation fähig sind, und Adenoviren vorwiegend für weniger schwerwiegende Atemwegserkrankungen verantwortlich sind, führt die Behandlung mit Ihnen zu starken Entzündungsreaktionen.

Die Messung der Lebertransaminasen zeigt deutlich erhöhte Werte in den ersten zwei Wochen nach HT, welche sich vier Wochen nach HT bereits normalisiert haben (Abb. 5.19C). Die Erhöhung der Transaminasen ist auf die Infektion der Hepatozyten durch Adenoviren zurückzuführen, ein Effekt welcher bereits beschrieben wurde (Christ et al. 2000). Hepatozyten, welche in Adeno-LacZ behandelte Empfänger transplantiert werden, wachsen nicht in der Leber an, sondern werden abgebaut.

Die tatsächliche Effektivität der c-Met Inhibierung durch Adeno-NK4 sollte nicht ausschließlich anhand der Repopulation gemessen werden. Um die Inhibierung des c-Met Signalweges auf Proteinebene zu untermauern, werden Mäuse mit Adeno-NK4 (Adeno-LacZ) und partieller Hepatektomie behandelt, welche in Wildtyp Mäusen nach 6 Stunden zu erhöhter Phosphorylierung des c-Met abhängigen Signaltransduktors STAT3 führt (Dierssen et al. 2008). Die Analyse von pSTAT3 in Adeno-LacZ und Adeno-NK4 behandelten Mäusen zeigt dabei allerdings keine signifikanten Unterschiede (Abb. 5.20A). Dem kann eine nicht ausreichende c-Met Inhibierung oder ein zu schwach gewählter Stimulus zu Grunde liegen. Darauf aufbauend werden Adeno-NK4 (Adeno-LacZ) transfizierte Mäuse durch intravenöse Stimulation mit dem c-Met Liganden HGF stimuliert. HGF führt als effektiver Stimulus des c-Met Signalweges bereits 2 Stunden nach Applikation zu verstärkter Phosphorylierung von STAT3 (Giebeler et al. 2009). Die Proteinexpressionsanalyse zeigt eine deutliche Inhibierung von pSTAT3 in Adeno-NK4 behandelten Mäusen. Tiere, welche mit dem Kontrollvektor behandelt werden zeigen eine starke Phosphorylierung von STAT 3 als Antwort auf die Stimulation mit HGF (Abb. 5.20B). Dieses Muster ist vergleichbar mit der STAT3 Expression in c-Met defizienten Mäusen nach HT, und untermauert somit die Effektivität der c-Met Inhibierung durch NK4.

Es bestehen verschiedene Möglichkeiten c-Met zu inhibieren. Die Verwendung von HGF-Antagonisten kann von uns als effektiv beschrieben werden. Sogenannte „small molecule inhibitors“ von Tyrosin Kinasen sind eine weitere vielversprechende Möglichkeit. Da c-Met durch seine pro-proliferative und pro-angiogenetische Funktion besonders im Bereich der Tumorforschung eine wichtige Rolle spielt, stellt die Inhibierung des Rezeptors

auch einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung von Tumor-Therapien dar (Osada, Yoshida 2010). Die spezifischsten c-Met Inhibitoren, wie SU11274 oder PHA665752 wurden zunächst vorwiegend *in vitro* angewendet (Puri et al. 2007; You et al. 2011; Ma et al. 2005; Inagaki et al. 2011), in den letzten Jahren jedoch auch zunehmend in *in vivo* Versuchen eingesetzt. Die Verwendung von SU11274 *in vivo* führte tatsächlich zu verringertem Tumorwachstum in malignen Melanomen sowie in Experimenten an Mäusen mit Magenkrebs (Kenessy et al. 2010; Toiyama et al. 2011).

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die Behandlung mit dem HGF-Antagonisten NK4 eine ausreichende Inhibition des c-Met Rezeptors erreicht werden kann um eine positive Spenderzellselektion zu veranlassen. Aufgrund der Problematiken, die bei einer Adenovirus-basierten Gentherapie entstehen können ist eine Weiterentwicklung dieses Therapieansatzes mit den sogenannten „small molecule Inhibitors“ zu empfehlen.

### **6.3. Repopulation nach HT in NEMO Mäusen**

Ein Großteil dieser Studien beschäftigt sich damit die Rolle des HGF-Rezeptors c-Met auf die Repopulation geschädigter Lebern durch transplantierte Spenderhepatozyten im Detail zu untersuchen. Dazu müssen die Lebern entsprechender Empfängertiere konditioniert werden um einen Repopulationsstimulus zu erreichen.

Anschließend daran wird die Hepatozytentransplantation auf Mäuse angewendet, welche bereits endogen eine Leberschädigung aufweisen. Ein potentiellies Maus-Modell dazu stellt die NEMO-*knockout* Maus dar. NEMO als regulatorische Untereinheit im NFkB Signalweg übt verschiedenste Funktionen im Bereich der Erhaltung der Leberstruktur aus. Die hier verwendeten konditionalen hepatozytenspezifischen NEMO defizienten Mäuse zeigen histologisch bereits mit 12 Wochen schwach fibrotische Bereiche. Im Alter von 52 Wochen ist die Leber von Tumoren fast vollständig durchsetzt (Lüdde et al. 2011).

NEMO defiziente Mäuse weisen mit fortschreitendem Alter erhöhte Apoptose auf, welche durch die Ausschüttung von TNF- $\alpha$  bedingt ist (Kerr et al. 1972). Um den Repopulationserfolg zu steigern und den TNF- $\alpha$  Einfluss auf transplantierte Spenderzellen gering zu halten, werden neben hAAT transgenen Wildtyp Spendern auch hAAT transgene Apoptose-resistente Spendermäuse verwendet. Dies geschieht unter der Annahme der

Hypothese, dass eine Inhibition von Rezeptor vermittelter Apoptose eine bessere Resistenz gegen TNF- $\alpha$  und damit eine vermehrte Selektion bewirken würden.

Zunächst werden 30 Wochen alte, NEMO defiziente Empfängerermäuse verwendet, welche bereits makroskopisch erkennbare Veränderungen der Leber aufweisen. Die Transplantation von hAAT transgenen Apoptose-resistenten Spenderzellen führt jedoch nicht zur erhofften Repopulation (Abb. 5.22). Die Empfängerlebern in diesem Alter weisen bereits immense Schädigungen auf, was auch an einer erhöhten Konzentration der Transaminasen zu sehen ist. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass nicht eine zu geringe Schädigung der Empfängerleber den Selektionsdruck auf Spenderzellen reduziert, sondern die Ausschüttung von Faktoren wie TNF $\alpha$  Spenderzellen an der Repopulation hindert. Zudem kann eine mangelnde Immunkompatibilität Grund für die fehlende Selektion sein.

Daraufhin wird die HT an Mäusen im Alter von 12 Wochen durchgeführt. Jedoch zeigt sich durch die Messung des Serum-hAAT Wertes nach 12 Wochen, dass es zu keiner Repopulation kommt, was darauf hindeutet, dass es offensichtlich noch zu keiner ausreichenden Schädigung gekommen ist, die eine positive Selektion der Spenderzellen erlauben (Abb. 5.23).

Aufgrund dieser Erkenntnis wird im nächsten Experiment eine Bestrahlung des Abdomens exklusive der Extremitäten vorgenommen. Auch hier zeigt die vier Wochen später durchgeführte HT mit Apoptose-resistenten hAAT(+) Spenderzellen keine erfolgreiche Repopulation (Abb. 5.24).

Da bereits bekannt ist, dass eine Knochenmarkstransplantation und die daraus resultierende CD4 Zellaktivierung einen bedeutenden Einfluss auf die Repopulation hat (Streetz et al. 2008), wird im letzten Schritt der gesamte Körper der Empfängerermäuse lethal bestrahlt und mit Zellen aus dem Stamm der zukünftigen Hepatozytenspender Knochenmarks-transplantiert. Mithilfe dieser Konditionierung kann eine erfolgreiche Repopulation durch erhöhte Serum-hAAT Werte sowie durch die Anfärbung der Spenderzellen in NEMO defizienten Empfängertieren nachgewiesen werden. WT Empfängertiere zeigen dagegen keine repopulierten Spenderzellen. Bereits 12 Wochen nach HT wird deutlich, dass Apoptose-resistente Spenderzellen besser repopulieren als WT Zellen. Um diesen Effekt weiter zu beobachten wird bei diesen Mäusen zunächst keine Organentnahme vorgenommen, sondern über den Zeitraum eines Jahres die Entwicklung

der Repopulation weiter beobachtet. Dabei verstärkt sich der Effekt, dass Apoptose-resistente Zellen besser repopulieren als WT Spenderzellen (Abb. 5.25 A, B). Obwohl wir bereits zeigen konnten, dass vorwiegend residente Zellen der Empfänger von Apoptose betroffen sind (Abb. 5.8C) (Kaldenbach et al. 2012), spielt die Apoptose der Spenderzellen bei der Transplantation in NEMO-defiziente Mäuse eine wesentliche Rolle.

52 Wochen nach HT kann anhand des makroskopischen Erscheinungsbildes der Lebern, des verbesserten Verhältnisses von Leber- zu Körpergewicht, sowie geringerer Transaminasen, und einer verbesserten Histologie, eine insgesamt erfolgreiche Repopulation der geschädigten Empfängerleber beobachtet werden (Abb. 5.26).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die Methode der Hepatozytentransplantation bei ausreichend hohem Selektionsdruck sowie ausreichendem Schutz der Spenderzellen vor Einflüssen wie Apoptose-begünstigenden Faktoren eignet geschädigte Lebern funktionell zu repopulieren. Es kommt dabei im NEMO Modell zu einer erheblich verbesserten Leberstruktur und einer Senkung der Transaminasen und hat damit therapeutische Auswirkungen.

## 7. Literaturverzeichnis

**Bardelli A**, Longati P, Albero D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM. HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J*. 1996 Nov 15;15(22):6205-12.

**Basma H**, Soto-Gutiérrez A, Yannam GR, Liu L, Ito R, Yamamoto T, Ellis E, Carson SD, Sato S, Chen Y, Muirhead D, Navarro-Alvarez N, Wong RJ, Roy-Chowdhury J, Platt JL, Mercer DF, Miller JD, Strom SC, Kobayashi N, Fox IJ. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):990-9.

**Benten D**, Kumaran V, Joseph B, Schattenberg J, Popov Y, Schuppan D, Gupta S. Hepatocyte transplantation activates hepatic stellate cells with beneficial modulation of cell engraftment in the rat. *Hepatology*. 2005 Nov;42(5):1072-81.

**Berry MN**, Friend DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol*. 1969 Dec;43(3):506-20.

**Birchmeier C**, Birchmeier W, Gherardi E, Vande Woude GF. Met, metastasis, motility and more. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Dec;4(12):915-25.

**Blagosklonny MV**, Pardee AB. The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle*. 2002 Mar-Apr;1(2):103-10.

**Bonizzi G**, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. 2004 Jun;25(6):280-8.

**Borowiak M**, Garratt AN, Wüstefeld T, Strehle M, Trautwein C, Birchmeier C. Met provides essential signals for liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10608-13.

**Bradford MM**. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

**Bulfinch's** Greek and Roman Mythology: The Age of Fable. *Dover Thrift Edition*. S.14

**Bumgardner GL**, Heininger M, Li J, Xia D, Parker-Thornburg J, Ferguson RM, Orosz CG. A functional model of hepatocyte transplantation for in vivo immunologic studies. *Transplantation*. 1998 Jan 15;65(1):53-61.

**Christ M**, Louis B, Stoeckel F, Dieterle A, Grave L, Dreyer D, Kintz J, Ali Hadji D, Lusky M, Mehtali M. Modulation of the inflammatory properties and hepatotoxicity of recombinant adenovirus vectors by the viral E4 gene products. *Hum Gene Ther*. 2000 Feb 10;11(3):415-27.

**Corpechot C**, Barbu V, Wendum D, Chignard N, Housset C, Poupon R, Rosmorduc O. Hepatocyte growth factor and c-Met inhibition by hepatic cell hypoxia: a potential mechanism for liver regeneration failure in experimental cirrhosis. *Am J Pathol*. 2002 Feb;160(2):613-20.

**Courtois G**, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 2006 Oct 30;25(51):6831-43.

**Date K**, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett*. 1997 Dec 22;420(1):1-6.

**Diehl AM**. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev*. 2000 Apr;174:160-71.

**Dierssen U**, Beraza N, Lutz HH, Liedtke C, Ernst M, Wasmuth HE, Trautwein C. Molecular dissection of gp130-dependent pathways in hepatocytes during liver regeneration. *J Biol Chem*. 2008 Apr 11;283(15):9886-95.

**Ding J**, Yannam GR, Roy-Chowdhury N, Hidvegi T, Basma H, Rennard SI, Wong RJ, Avsar Y, Guha C, Perlmutter DH, Fox IJ, Roy-Chowdhury J. Spontaneous hepatic repopulation in transgenic mice expressing mutant human  $\alpha$ 1-antitrypsin by wild-type donor hepatocytes. *J Clin Invest*. 2011 May 2;121(5):1930-4.

**Donate LE**, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S, Blundell TL. Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci*. 1994 Dec;3(12):2378-94.

**Duncan AW**, Dorrell C, Grompe M. Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*. 2009 Aug;137(2):466-81.

**Erker L**, Azuma H, Lee AY, Guo C, Orloff S, Eaton L, Benedetti E, Jensen B, Finegold M, Willenbring H, Grompe M. Therapeutic liver reconstitution with murine cells isolated long after death. *Gastroenterology*. 2010 Sep;139(3):1019-29.

**Factor VM**, Seo D, Ishikawa T, Kaposi-Novak P, Marquardt JU, Andersen JB, Conner EA, Thorgeirsson SS. Loss of c-Met disrupts gene expression program required for G2/M progression during liver regeneration in mice. *PLoS One*. 2010 Sep 16;5(9). pii: e12739.

**Fan S**, Ma YX, Gao M, Yuan RQ, Meng Q, Goldberg ID, Rosen EM. The multisubstrate adapter Gab1 regulates hepatocyte growth factor (scatter factor)-c-Met signaling for cell survival and DNA repair. *Mol Cell Biol*. 2001 Aug;21(15):4968-84.

**Fausto N**. Liver regeneration. *J Hepatol*. 2000;32(1 Suppl):19-31.

**FitzGerald MJ**, Webber EM, Donovan JR, Fausto N. Rapid DNA binding by nuclear factor kappa B in hepatocytes at the start of liver regeneration. *Cell Growth Differ*. 1995 Apr;6(4):417-27.

**Fox IJ**, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, Dorko K, Sauter BV, Strom SC. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1998 May 14;338(20):1422-6.

- Gherardi E**, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamele L, Gough J, Bandyopadhyay A, Hartmann G, Butler PJ. Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12039-44. Epub 2003 Oct 3.
- Giebeler A**, Boekschoten MV, Klein C, Borowiak M, Birchmeier C, Gassler N, Wasmuth HE, Müller M, Trautwein C, Streetz KL. c-Met confers protection against chronic liver tissue damage and fibrosis progression after bile duct ligation in mice. *Gastroenterology*. 2009 Jul;137(1):297-308.
- Gordon GJ**, Coleman WB, Hixson DC, Grisham JW. Liver regeneration in rats with retrorsine induced hepatocellular injury proceeds through a novel cellular response. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):607-19.
- Grompe M**, Liver repopulation for the treatment of metabolic diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2001 Apr;24(2):231-44.
- Groth CG**, Arborgh B, Björkén C, Sundberg B, Lundgren G. Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyltransferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *Transplant Proc*. 1977 Mar;9(1):313-6.
- Guha C**, Deb NJ, Sappal BS, Ghosh SS, Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Amplification of engrafted hepatocytes by preparative manipulation of the host liver. *Artif Organs*. 2001 Jul;25(7):522-8.
- Guo D**, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE. Guo D, Fu T, Nelson JA, Superina RA, Soriano HE. Liver repopulation after cell transplantation in mice treated with retrorsine and carbon tetrachloride. *Transplantation*. 2002 Jun 15;73(11):1818-24.
- Gupta S**, Aragona E, Vemuru RP, Bhargava KK, Burk RD, Chowdhury JR. Permanent engraftment and function of hepatocytes delivered to the liver: implications for gene therapy and liver repopulation. *Hepatology*. 1991 Jul;14(1):144-9.
- Gupta S**, Rajvanshi P, Lee CD. Integration of transplanted hepatocytes into host liver plates demonstrated with dipeptidyl peptidase IV-deficient rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 20;92(13):5860-4.
- Gupta S**, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology*. 1999 Feb;29(2):509-19.
- Haga S**, Terui K, Zhang HQ, Enosawa S, Ogawa W, Inoue H, Okuyama T, Takeda K, Akira S, Ogino T, Irani K, Ozaki M. Stat3 protects against Fas-induced liver injury by redox-dependent and -independent mechanisms. *J Clin Invest*. 2003 Oct;112(7):989-98.
- Hamilton DL**, Abremski K. Site-specific recombination by the bacteriophage P1 lox-Cre system. Cre-mediated synapsis of two lox sites. *J Mol Biol*. 1984 Sep 15;178(2):481-6.

**Harbour JW**, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999 Sep 17;98(6):859-69.

**Heideman DA**, van Beusechem VW, Bloemena E, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Derksen PW, de Bruin M, Witlox MA, Molenaar B, Meijer CJ, Gerritsen WR. Suppression of tumor growth, invasion and angiogenesis of human gastric cancer by adenovirus-mediated expression of NK4. *J Gene Med*. 2004 Mar;6(3):317-27.

**Heideman DA**, Overmeer RM, van Beusechem VW, Lamers WH, Hakvoort TB, Snijders PJ, Craanen ME, Offerhaus GJ, Meijer CJ, Gerritsen WR. Inhibition of angiogenesis and HGF-cMET-elicited malignant processes in human hepatocellular carcinoma cells using adenoviral vector-mediated NK4 gene therapy. *Cancer Gene Ther*. 2005 Dec;12(12):954-62.

**Higgins GM**, Anderson RM. Experimental Pathology of the Liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Path* 01 1931 12: 186.-202.

**Huh CG**, Factor VM, Sánchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30;101(13):4477-82.

**Igarashi Y**, Tateno C, Tanaka Y, Tachibana A, Utoh R, Kataoka M, Ohdan H, Asahara T, Yoshizato K. Engraftment of human hepatocytes in the livers of rats bearing bone marrow reconstructed with immunodeficient mouse bone marrow cells. *Xenotransplantation*. 2008 Jul-Aug;15(4):235-45.

**Inagaki Y**, Qi F, Gao J, Qu X, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Effect of c-Met inhibitor SU11274 on hepatocellular carcinoma cell growth. *Biosci Trends*. 2011;5(2):52-6.

**Jiang WG**, Hiscox SE, Parr C, Martin TA, Matsumoto K, Nakamura T, Mansel RE. Antagonistic effect of NK4, a novel hepatocyte growth factor variant, on in vitro angiogenesis of human vascular endothelial cells. *Clin Cancer Res*. 1999 Nov;5(11):3695-703.

**Jie JZ**, Wang JW, Qu JG, Hung T. Suppression of human colon tumor growth by adenoviral vector-mediated NK4 expression in an athymic mouse model. *World J Gastroenterology*. 2007 Apr 7;13(13):1938-46.

**Joseph B**, Malhi H, Bhargava KK, Palestro CJ, McCuskey RS, Gupta S. Kupffer cells participate in early clearance of syngeneic hepatocytes transplanted in the rat liver. *Gastroenterology*. 2002 Nov;123(5):1677-85.

**Kaldenbach M**, Giebeler A, Tschaharganeh DF, Erschfeld S, Wasmuth HE, Dolle L, Floege J, Trautwein C, Streetz KL. Hepatocyte growth factor/c-Met signalling is important for the selection of transplanted hepatocytes. *Gut*. 2012 Jan 27. [Epub ahead of print]

**Karin M**, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:621-63.



**Karin M**, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002 Mar;3(3):221-7.

**Karin M**, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):749-59.

**Karin M**. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):431-6.

**Kawahara T**, Toso C, Douglas DN, Nourbakhsh M, Lewis JT, Tyrrell DL, Lund GA, Churchill TA, Kneteman NM. Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl*. 2010 Aug;16(8):974-82.

**Kellendonk C**, Opherck C, Anlag K, Schütz G, Tronche F. Hepatocyte-specific expression of Cre recombinase. *Genesis*. 2000 Feb;26(2):151-3.

**Kenessey I**, Keszthelyi M, Krámer Z, Berta J, Adám A, Dobos J, Mildner M, Flachner B, Cseh S, Barna G, Szokol B, Orfi L, Kéri G, Döme B, Klepetko W, Tímár J, Tóvári J. Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma. *Curr Cancer Drug Targets*. 2010 May;10(3):332-42.

**Kerr JF**, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57.

**Koniaris LG**, McKillop IH, Schwartz SI, Zimmers TA. Liver regeneration. *J Am Coll Surg*. 2003 Oct;197(4):634-59.

**Koenig S**, Krause P, Schmidt TK, Rave-Fraenk M, Rothe H, Hermann RM, Becker H, Hess CF, Christiansen H. Irradiation as preparative regimen for hepatocyte transplantation causes prolonged cell cycle block. *Int J Radiat Biol*. 2008 Apr;84(4):285-98.

**Krohn N**, Kapoor S, Enami Y, Follenzi A, Bandi S, Joseph B, Gupta S. Hepatocyte transplantation-induced liver inflammation is driven by cytokines-chemokines associated with neutrophils and Kupffer cells. *Gastroenterology*. 2009 May;136(5):1806-17.

**Kuba K**, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T. HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res*. 2000 Dec 1;60(23):6737-43.

**Kubota T**, Taiyoh H, Matsumura A, Murayama Y, Ichikawa D, Okamoto K, Fujiwara H, Ikoma H, Nakanishi M, Kikuchi S, Ochiai T, Sakakura C, Kokuba Y, Sonoyama T, Suzuki Y, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. Gene transfer of NK4, an angiogenesis inhibitor, induces CT26 tumor regression via tumor-specific T lymphocyte activation. *Int J Cancer*. 2009 Dec 15;125(12):2879-86.

**Kühn R**, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice. *Science*. 1995 Sep 8;269(5229):1427-9.

**Kumaran V**, Joseph B, Benten D, Gupta S. Integrin and extracellular matrix interactions regulate engraftment of transplanted hepatocytes in the rat liver. *Gastroenterology*. 2005 Nov;129(5):1643-53.

**Laconi E**, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P, Dabeva MD, Shafritz DA. Long-term, near-total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrorsine. *Am J Pathol*. 1998 Jul;153(1):319-29.

**Laemmli UK**. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

**Liedtke C**, Bangen JM, Freimuth J, Beraza N, Lambertz D, Cubero FJ, Hatting M, Karlmark KR, Streetz KL, Krombach GA, Tacke F, Gassler N, Riethmacher D, Trautwein C. Loss of caspase-8 protects mice against inflammation-related hepatocarcinogenesis but induces non-apoptotic liver injury. *Gastroenterology*. 2011 Dec;141(6):2176-87.

**Longati P**, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene*. 1994 Jan;9(1):49-57.

**Luedde T**, Schwabe RF. NF- $\kappa$ B in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Feb;8(2):108-18.

**Ma PC**, Jagadeeswaran R, Jagadeesh S, Tretiakova MS, Nallasura V, Fox EA, Hansen M, Schaefer E, Naoki K, Lader A, Richards W, Sugarbaker D, Husain AN, Christensen JG, Salgia R. Functional expression and mutations of c-Met and its therapeutic inhibition with SU11274 and small interfering RNA in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1479-88.

**Maemondo M**, Narumi K, Saijo Y, Usui K, Tahara M, Tazawa R, Hagiwara K, Matsumoto K, Nakamura T, Nukiwa T. Targeting angiogenesis and HGF function using an adenoviral vector expressing the HGF antagonist NK4 for cancer therapy. *Mol Ther*. 2002 Feb;5(2):177-85.

**Maina F**, Klein R. Hepatocyte growth factor, a versatile signal for developing neurons. *Nat Neurosci*. 1999 Mar;2(3):213-7.

**Malato Y**. Role of the IKK complex during liver regeneration. Analysis of the differential role of IKK $\beta$ /IKK2 and IKK $\gamma$ /Nemo during liver regeneration

**Malhi H**, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology*. 2008 May;134(6):1641-54.

**Mars WM**, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Activation of hepatocyte growth factor by the Plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol*. 1993 Sep;143(3):949-58.

**Matsumoto K**, Takehara T, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nakamura T. Deletion of kringle domains or the N-terminal hairpin structure in hepatocyte growth factor results in marked decreases in related biological activities. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Dec 16;181(2):691-9.

**Matsumoto K**, Nakamura T. Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases. *Kidney Int.* 2001 Jun;59(6):2023-38.

**Michalopoulos GK**, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):60-6.

**Minato M**, Houssin D, Demma I, Morin J, Gigou M, Szekely AM, Bismuth H. Transplantation of hepatocytes for treatment of surgically induced acute hepatic failure in the rat. *Eur Surg Res.* 1984;16(3):162-9.

**Mizuno K**, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nose T, Shimohigashi Y, Nakamura T. Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem.* 1994 Jan 14;269(2):1131-6.

**Mörke**, Betz , Mergenthaler. Biologie des Menschen 15. Auflage

**Moriya K**, Yoshikawa M, Saito K, Ouji Y, Nishiofuku M, Hayashi N, Ishizaka S, Fukui H. Embryonic stem cells develop into hepatocytes after intrasplenic transplantation in CCl<sub>4</sub>-treated mice. *World J Gastroenterol.* 2007 Feb 14;13(6):866-73.

**Moshage HJ**, Rijntjes PJ, Hafkenscheid JC, Roelofs HM, Yap SH. Primary culture of cryopreserved adult human hepatocytes on homologous extracellular matrix and the influence of monocytic products on albumin synthesis. *J Hepatol.* 1988 Aug;7(1):34-44.

**Nagata H**, Ito M, Shirota C, Edge A, McCowan TC, Fox IJ. Route of hepatocyte delivery affects hepatocyte engraftment in the spleen. *Transplantation.* 2003 Aug 27;76(4):732-4.

**Nakabayashi M**, Morishita R, Nakagami H, Kuba K, Matsumoto K, Nakamura T, Tano Y, Kaneda Y. HGF/NK4 inhibited VEGF-induced angiogenesis in in vitro cultured endothelial cells and in vivo rabbit model. *Diabetologia.* 2003 Jan;46(1):115-23.

**Nakamura T**. Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res.* 1991;3(1):67-85.

**Nakamura T**, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010 Jan;10(1):36-46.

**Naldini L**, Tamagnone L, Vigna E, Sachs M, Hartmann G, Birchmeier W, Daikuhara Y, Tsubouchi H, Blasi F, Comoglio PM. Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.* 1992 Dec;11(13):4825-33.

**Oertel M**, Menthen A, Dabeva MD, Shafritz DA. Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells. *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):507-20;

**Osada S**, Yoshida K. Application of biological study for met expression to cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2010 Jan;10(1):58-63.

**Overturf K**, Al-Dhalimy M, Tanguay R, Brantly M, Ou CN, Finegold M, Grompe M. Hepatocytes corrected by gene therapy are selected in vivo in a murine model of hereditary tyrosinaemia type I. *Nat Genet.* 1996 Mar;12(3):266-73.

**Perkins ND.** Oncogenes, tumor suppressors and p52 NF-kappaB. *Oncogene*. 2003 Oct 23;22(48):7553-6.

**Perz JF,** Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006 Oct;45(4):529-38.

**Ponder KP,** Gupta S, Leland F, Darlington G, Finegold M, DeMayo J, Ledley FD, Chowdhury JR, Woo SL. Mouse hepatocytes migrate to liver parenchyma and function indefinitely after intrasplenic transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 15;88(4):1217-21.

**Ponzetto C,** Zhen Z, Audero E, Maina F, Bardelli A, Basile ML, Giordano S, Narsimhan R, Comoglio P. Specific uncoupling of GRB2 from the Met receptor. Differential effects on transformation and motility. *J Biol Chem*. 1996 Jun 14;271(24):14119-23.

**Potempa S,** Ridley AJ. Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell*. 1998 Aug;9(8):2185-200.

**Puri N,** Ahmed S, Janamanchi V, Tretiakova M, Zumba O, Krausz T, Jagadeeswaran R, Salgia R. c-Met is a potentially new therapeutic target for treatment of human melanoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 1;13(7):2246-53.

**Rajvanshi P,** Kerr A, Bhargava KK, Burk RD, Gupta S. Efficacy and safety of repeated hepatocyte transplantation for significant liver repopulation in rodents. *Gastroenterology*. 1996 Oct;111(4):1092-1102.

**Rhim JA,** Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science*. 1994 Feb 25;263(5150):1149-52.

**Rhim JA,** Sandgren EP, Palmiter RD, Brinster RL. Complete reconstitution of mouse liver with xenogeneic hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 23;92(11):4942-6.

**Ridley AJ,** Comoglio PM, Hall A. Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol*. 1995 Feb;15(2):1110-22.

**Rong S,** Segal S, Anver M, Resau JH, Vande Woude GF. Invasiveness and metastasis of NIH 3T3 cells induced by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 24;91(11):4731-5.

**Royal I,** Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M. Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol Biol Cell*. 2000 May;11(5):1709-25.

**Rudolph D, Yeh WC,** Wakeham A, Rudolph B, Nallainathan D, Potter J, Elia AJ, Mak TW. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*. 2000 Apr 1;14(7):854-62.

**Saimura M**, Nagai E, Mizumoto K, Maehara N, Okino H, Katano M, Matsumoto K, Nakamura T, Narumi K, Nukiwa T, Tanaka M. Intraperitoneal injection of adenovirus-mediated NK4 gene suppresses peritoneal dissemination of pancreatic cancer cell line AsPC-1 in nude mice. *Cancer Gene Ther.* 2002 Oct;9(10):799-806.

**Sakata H**, Takayama H, Sharp R, Rubin JS, Merlino G, LaRochelle WJ. Hepatocyte growth factor/scatter factor overexpression induces growth, abnormal development, and tumor formation in transgenic mouse livers. *Cell Growth Differ.* 1996 Nov;7(11):1513-23.

**Sandgren EP**, Palmiter RD, Heckel JL, Daugherty CC, Brinster RL, Degen JL. Complete hepatic regeneration after somatic deletion of an albumin-plasminogen activator transgene. *Cell.* 1991 Jul 26;66(2):245-56.

**Schmidt C**, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature.* 1995 Feb 23;373(6516):699-702.

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

**Shen RF**, Li Y, Sifers RN, Wang H, Hardick C, Tsai SY, Woo SL. Tissue-specific expression of the human alpha 1-antitrypsin gene is controlled by multiple cis-regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 1987 Oct 26;15(20):8399-415.

**Son G**, Hirano T, Seki E, Iimuro Y, Nukiwa T, Matsumoto K, Nakamura T, Fujimoto J. Blockage of HGF/c-Met system by gene therapy (adenovirus-mediated NK4 gene) suppresses hepatocellular carcinoma in mice. *J Hepatol.* 2006 Nov;45(5):688-95.

**Stolz DB**, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res.* 1999 Aug 15;59(16):3954-60.

**Streetz K**, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C. Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology.* 2000 Aug;119(2):446-60.

**Streetz KL**, Doyonnas R, Grimm D, Jenkins DD, Fuess S, Perryman S, Lin J, Trautwein C, Shizuru J, Blau H, Sylvester KG, Kay MA. Hepatic parenchymal replacement in mice by transplanted allogeneic hepatocytes is facilitated by bone marrow transplantation and mediated by CD4 cells. *Hepatology.* 2008 Feb;47(2):706-18.

**Sutherland DE**, Matas AJ, Steffes MW, Simmons RL, Najarian JS. Transplantation of liver cells in an animal model of congenital enzyme deficiency disease: the Gunn rat. *Transplant Proc.* 1977 Mar;9(1):317-9.

**Suzuki A**, Zheng YW, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Liver repopulation by c-Met-positive stem/progenitor cells isolated from the developing rat liver. *Hepatogastroenterology.* 2004 Mar-Apr;51(56):423-6.

**Takayama H**, LaRoche WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):701-6.

**Taub R**. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 Oct;5(10):836-47.

**Toiyama Y**, Yasuda H, Saigusa S, Matsushita K, Fujikawa H, Tanaka K, Mohri Y, Inoue Y, Goel A, Kusunoki M. Co-expression of hepatocyte growth factor and c-Met predicts peritoneal dissemination established by autocrine hepatocyte growth factor/c-Met signaling in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2011 Jul 27

**Tschaharganeh DF**, Kaldenbach M, Erschfeld S, Tischendorf JJ, Trautwein C, Streetz KL. Glycoprotein 130-dependent pathways in host hepatocytes are important for liver repopulation in mice. *Liver Transpl*. 2010 Jan;16(1):23-32.

**Uehara Y**, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*. 1995 Feb 23;373(6516):702-5.

**Ueki T**, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1997 Apr;25(4):862-6

**Vucur M**, Roderburg C, Bettermann K, Tacke F, Heikenwalder M, Trautwein C, Luedde T. Mouse models of hepatocarcinogenesis: what can we learn for the prevention of human hepatocellular carcinoma? *Oncotarget*. 2010 Sep;1(5):373-8.

**Wang X**, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11881-8.

**Weidner KM**, Di Cesare S, Sachs M, Brinkmann V, Behrens J, Birchmeier W. Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis. *Nature*. 1996 Nov 14;384(6605):173-6.

**Witek RP**, Fisher SH, Petersen BE. Monocrotaline, an alternative to retrorsine-based hepatocyte transplantation in rodents. *Cell Transplant*. 2005;14(1):41-7.

**Xiao GH**, Jeffers M, Bellacosa A, Mitsuuchi Y, Vande Woude GF, Testa JR. Anti-apoptotic signaling by hepatocyte growth factor/Met via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 2;98(1):247-52.

**Yamaoka S**, Courtois G, Bessia C, Whiteside ST, Weil R, Agou F, Kirk HE, Kay RJ, Israël A. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell*. 1998 Jun 26;93(7):1231-40.

**You H**, Ding W, Dang H, Jiang Y, Rountree CB. c-Met represents a potential therapeutic target for personalized treatment in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011 Sep 2;54(3):879-89.

**Zandi E**, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell*. 1997 Oct 17;91(2):243-52.

**Zarnegar R**, DeFrances MC, Kost DP, Lindroos P, Michalopoulos GK. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 May 31;177(1):559-65.

**Zeng ZS**, Weiser MR, Kuntz E, Chen CT, Khan SA, Forslund A, Nash GM, Gimbel M, Yamaguchi Y, Culliford AT 4th, D'Alessio M, Barany F, Paty PB. c-Met gene amplification is associated with advanced stage colorectal cancer and liver metastases. *Cancer Lett*. 2008 Jul 8;265(2):258-69.

## 8. Publikationen

**Kaldenbach M.**, Giebeler A., Tschaharganeh D.F., Erschfeld S., Wasmuth H., Dolle L., Floege J., Trautwein C., Streetz K.L.

*HGF/c-Met signalling is important for the selection of transplanted hepatocytes*

GUT 2012 Jan online first

Tschaharganeh D.F., **Kaldenbach M.**, Erschfeld S., Tischendorf J.J., Trautwein C., Streetz K.L.

*Glycoprotein 130-dependent pathways in host hepatocytes are important for liver repopulation in mice*

Liver Transpl. 2010 Jan;16(1):23-32.

### **Poster-Präsentationen**

26. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) 2010 in Bonn

*Das HGF/c-Met System stellt einen wichtigen Faktor der Leberrepopulation nach Hepatozytentransplantation dar*

45th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) 2010 in Vienna

*The HGF/c-Met System Plays a Central Role in Liver Regeneration after Hepatocyte-Transplantation*

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS) 2010 in Stuttgart

*Das HGF/c-Met System ist ein determinierender Faktor der Leberrepopulation nach Hepatozytentransplantation*



19. Tagung der Gesellschaft für Gastroenterologie in Nordrhein-Westfalen 2010 in Oberhausen

*Das HGF/c-Met System als wichtiger Faktor der Leberrepopulation nach Hepatozytentransplantation*

27. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) 2011 in Regensburg

*HGF/c-Met und NEMO stellen wichtige Determinanten der Zellselektion im Hepatozytentransplantationsmodell dar.*

28. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber (GASL) 2012 in Hamburg

*Die Transplantation Apoptose-resistenter (Caspase8<sup>Δhepa</sup>)Hepatozyten führt zur erfolgreichen Repopulation und Reduktion der Entzündungsaktivität im NEMO-/- Mausmodell*

47th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) 2012 in Barcelona

*The HGF Receptor c-Met is protective during acute and chronic liver injury*

### **Vortrags-Beiträge**

46th annual meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL) 2011 in Berlin

*HGF/c-met and NEMO-dependent Signalling pathways are crucial for positive cell selection and engraftment after hepatocyte transplantation*

## 9. Abkürzungsverzeichnis

### **A**

|               |                           |
|---------------|---------------------------|
| Abb.          | Abbildung                 |
| APS           | Ammoniumpersulfat         |
| ALT           | Alanin-Aminotransferase   |
| $\alpha$ -SMA | alpha-smooth muscle actin |
| AST           | Aspartat-Aminotransferase |
| ATP           | Adenosin-triphosphat      |

### **B**

|      |                      |
|------|----------------------|
| BrdU | Bromodesoxyuridin    |
| BSA  | Bovines Serumalbumin |

### **C**

|                  |                                           |
|------------------|-------------------------------------------|
| °C               | Grad Celsius                              |
| ca.              | circa                                     |
| Ca               | Calcium                                   |
| Caspase          | cysteiny l aspertate-specific proteinases |
| CCl <sub>4</sub> | Tetrachlorkohlenwasserstoff               |
| Cdk              | cyclin-dependent kinase                   |
| cDNA             | complementary DNA                         |
| c-met            | Mesenchymal epithelial transition factor  |
| cre              | causes recombination                      |
| ctrl             | Control                                   |

### **D**

|                   |                                                 |
|-------------------|-------------------------------------------------|
| d                 | days                                            |
| $\Delta$ hepa     | hepatocyte specific <i>knockout</i>             |
| DAB               | 3,3'-Diaminobenzidine                           |
| DAPI              | 4',6- Diamidino- 2- phenylindole Dihydrochlorid |
| DEN               | Dimethylnitrosamin                              |
| DEPC              | Diethyl-Pyrocarbonat                            |
| dH <sub>2</sub> O | destilliertes Wasser                            |
| DMEM              | Dulbeccos minimum essential medium              |
| dNTPs             | deoxyribonucleotides                            |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                          |
| ds                | doppelsträngig                                  |

### **E**

|             |                                                             |
|-------------|-------------------------------------------------------------|
| E           | Extinktion                                                  |
| EBSS        | Earles basic salt solution                                  |
| ECL         | enhanced chemiluminescence                                  |
| EDTA        | ethylene-diamine-tetraascorbate                             |
| <i>e.g.</i> | for example <i>lat. exempli gratia</i>                      |
| EGTA        | ethylen glycol-bis (2-aminoethyl)- N,N';N',N'- tetraacetate |
| ELISA       | enzyme linked immunosorbent assay                           |
| Erk         | extracellular signal-regulated kinase                       |

|                 |                                                    |
|-----------------|----------------------------------------------------|
| EtBr            | Ethidiumbromid                                     |
| EtOH            | Ethanol                                            |
| <b><u>F</u></b> |                                                    |
| FCS             | fetal calf serum                                   |
| fwd             | forward                                            |
| <b><u>G</u></b> |                                                    |
| g               | Gramm                                              |
| G               | gauge                                              |
| Gab1            | GRB2-associated-binding protein 1                  |
| GAPDH           | Glyceraldehyd-3-Phosphate Dehydrogenase            |
| Gy              | Gray                                               |
| <b><u>H</u></b> |                                                    |
| h               | hour                                               |
| hAAT            | humanes $\alpha$ 1-Antitrypsin                     |
| HBSS            | Hank's Buffered Salt Solution                      |
| HCC             | hepatocellular carcinoma                           |
| HCL             | Salzsäure                                          |
| H&E             | Hämatoxylin/Eosin                                  |
| HEPES           | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid |
| HGF             | Hepatocyte Growth Factor                           |
| HRP             | Horseradish Peroxidase                             |
| HSC             | hepatic stellate cells                             |
| HT              | Hepatozytentransplantation                         |
| <b><u>I</u></b> |                                                    |
| I $\kappa$ B    | Inhibitor von kappaB                               |
| i.p.            | intraperitoneal                                    |
| i.v.            | intravenös                                         |
| <b><u>J</u></b> |                                                    |
| JNK             | c-Jun N-terminal Kinase                            |
| <b><u>K</u></b> |                                                    |
| kg              | Kilogramm                                          |
| KMT             | Knochenmarkstransplantation                        |
| <b><u>L</u></b> |                                                    |
| l               | Liter                                              |
| loxP            | locus of crossing over                             |
| <b><u>M</u></b> |                                                    |
| $\mu$           | mikro                                              |
| M               | Mol                                                |
| Mg              | Magnesium                                          |
| min             | Minuten                                            |
| ml              | milliliter                                         |
| mm              | milimeter                                          |
| mRNA            | messenger Ribonucleic Acid                         |
| <b><u>N</u></b> |                                                    |
| NaCl            | Natrium Chlorid                                    |

|                 |                                                                                 |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| NEMO            | NF-kappaB essential modulator                                                   |
| NF-κB           | Nuclear Faktor kappa B                                                          |
| nm              | nanometer                                                                       |
| <b><u>O</u></b> |                                                                                 |
| OD              | Optische Dichte                                                                 |
| <b><u>P</u></b> |                                                                                 |
| p-              | phospho-                                                                        |
| PBS             | Phosphat-buffert saline                                                         |
| PCR             | Polymerase Chain Reaction                                                       |
| PFA             | Paraformaldehyd                                                                 |
| PH              | partielle Hepatektomie                                                          |
| pH              | potentia hydrogenii                                                             |
| PMSF            | phenylmethyl sulfonyl fluoride                                                  |
| <b><u>R</u></b> |                                                                                 |
| Raf             | Ras-activated factor                                                            |
| Ras             | rat sarcoma                                                                     |
| Rev.            | reverse                                                                         |
| RNA             | Ribonucleic acid                                                                |
| rpm             | Runden pro Minute                                                               |
| RT              | Raumtemperatur                                                                  |
| RT PCR          | Reverse Transkriptions-PCR                                                      |
| <b><u>S</u></b> |                                                                                 |
| s               | sense                                                                           |
| SDS             | Sodiumdodecylsulphat                                                            |
| STAT3           | Signal Transducer and Activator of Transcription 3                              |
| <b><u>T</u></b> |                                                                                 |
| TAE             | Tris-Acetat-EDTA                                                                |
| TBS             | Tris-buffered saline                                                            |
| TEMED           | N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin                                             |
| TGF             | transforming growth factor                                                      |
| TMB             | tetramethylbenzidine substrate                                                  |
| TNF-α           | tumor necrosis factor-alpha                                                     |
| TUNEL           | terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin<br>nick end labelling |
| <b><u>U</u></b> |                                                                                 |
| U               | unit                                                                            |
| UKA             | Universitätsklinikum Aachen                                                     |
| uPA             | Urokinase Plasminogen Aktivator                                                 |
| <b><u>V</u></b> |                                                                                 |
| V               | Volt                                                                            |
| <b><u>W</u></b> |                                                                                 |
| WT              | Wildtyp                                                                         |
| <b><u>Z</u></b> |                                                                                 |
| z.B.            | zum Beispiel                                                                    |

## 10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Michaela Kaltenbach, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

**Mechanismen der Leberrepopulation in einem Mausmodell zur  
Hepatozytentransplantation - eine besondere Rolle von c-Met und NEMO**

selbständig verfasst habe.

Bei der Anfertigung wurden folgende Hilfen Dritter in Anspruch genommen:

1. In der Abteilung für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und internistische Intensivmedizin (medizinische Klinik III) im Universitätsklinikum Aachen habe ich die Versuche mit den im Kapitel „*Material und Methoden*“ aufgeführten Hilfen und Hilfsmitteln durchgeführt.
2. Die Anfertigung erfolgte unter der Leitung von PD Dr. med Konrad Streetz, Abteilung für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und internistische Intensivmedizin (medizinische Klinik III) im Universitätsklinikum Aachen, die fachliche Betreuung wurde von Prof. Dr. rer. nat Hermann Wagner Abteilung Zoologie und Tierphysiologie, Institut für Biologie II der RWTH Aachen, übernommen.

Ich habe keine entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar entgeltliche Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Synthesen der verwendeten Primer, Sonden und Antikörper wurden von den jeweils erwähnten Firmen durchgeführt.

Ich habe die Dissertation an folgenden Instituten angefertigt:

Abteilung für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und internistische Intensivmedizin (medizinische Klinik III) im Universitätsklinikum Aachen.

Die Dissertation wurde bisher nicht für eine Prüfung oder Promotion oder für einen ähnlichen Zweck zur Beurteilung eingereicht.

Ich versichere, dass ich die vorstehenden Angaben nach bestem Wissen vollständig und der Wahrheit entsprechend gemacht habe.

**Hiermit bestätige ich, dass die Experimente, die den Ergebnissen dieser Dissertation zu Grunde liegen, ausschließlich von den nachstehend aufgeführten Personen durchgeführt wurden.**

**Entwicklung und Planung der Versuchsreihen:** Michaela Kaldenbach;  
PD Dr. med Konrad Streetz

**Tierexperimentelle Arbeiten:**

Chirurgische Eingriffe (partielle Hepatektomie; Isolation primärer Hepatozyten; Bestrahlung; Knochenmarkstransplantation; Hepatozyten-Transplantation); Blutentnahme; Organentnahme

Michaela Kaldenbach

Entnehmen von Schwanzbiopsien

Michaela Kaldenbach;  
Stephanie Erschfeld

**Molekularbiologische Methoden:**

DNA-, und RNA-Isolationen; Genotypisierungen; quantitative PCR

Michaela Kaldenbach

**Proteinbiochemische Methoden:**

Proteinisolierung aus Lebergewebe; Western-Blot

Stephanie Erschfeld

ELISA

Michaela Kaldenbach

**Färben von Gewebeschnitten:**

Ki67- $\beta$ -Catenin; F4/80

Stephanie Erschfeld

hAAT (hAAT-BrdU); TUNEL; CD4; CD11b; Collagen-hAAT;  $\alpha$ -SMA; H&E; Sirius Rot;

Michaela Kaldenbach

Mikroskopisches Fotografieren und Auswertung der Färbungen

Michaela Kaldenbach

**Auswertungen und statistische Erfassung:** Michaela Kaldenbach

## 11. Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med Konrad Streetz für die Überlassung dieser interessanten Fragestellung und die Übernahme des Gutachtens bedanken. Ich danke herzlich für die freundliche Aufnahme in die „AG Streetz“ und die hervorragende Betreuung. Ich bedanke mich auch für die Geduld mir wissenschaftliches Denken und Präsentieren beizubringen. Ich habe von der Zeit in der „AG Streetz“ sehr profitiert.

Ein großer Dank gilt Herrn Professor Hermann Wagner (Institut für Zoologie und Tierphysiologie; RWTH Aachen) für die freundliche und unkomplizierte Betreuung meiner Arbeit.

Vielen Dank an Herrn Professor Trautwein (Klinik für Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und internistische Intensivmedizin) für die nette Aufnahme in seiner Abteilung und die Möglichkeit meine Arbeit in seinem Institut durchführen zu dürfen.

Der Arbeitsgruppe Streetz danke ich für die hilfsbereite, familiäre und positive Arbeitsatmosphäre im Labor. Dabei möchte ich besonders Stephanie Erschfeld danken, welche mir stets Rat und Tat zur Seite stand (danke für den rettenden Blot!) und deren enorme Hilfsbereitschaft und Freundschaft hier erwähnt werden müssen.

Ein großer Dank geht an alle Labor-Mitarbeiter/innen der med. Klinik III, die es einem durch das stets angenehme Arbeitsklima leicht gemacht haben gerne zur Arbeit zu kommen. Danke an die Mittag-Essens Gruppe Stephanie Erschfeld, Hacer Sahin, Daniel Heinrichs, Andreas Nellen, Muhammad Al-samman und David Scholten, für die obligatorische Mittagspause. Auch Malika Al Masaoudi, Sara Sackett, Marie Berres, Daniela Lambertz, Jörg Bangen, Eveline Bennek, Daniela Kroy, Christian Liedtke und Jörn Janssen danke ich für die schöne Zusammenarbeit und das freundschaftliche Miteinander.

## Danksagung

---

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Birgit Müller bedanken, die sich stets kompetent, zuverlässig und un-bürokratisch um meine Versuchmäuse gekümmert hat.

Ein großer Dank geht selbstverständlich an meine Eltern und meine Schwester für das liebevollste Umfeld, das man sich nur wünschen kann.

Und ohne Dich hätte ich das sowieso nie geschafft. Danke Christoph.



## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

|                     |                            |
|---------------------|----------------------------|
| Name                | Michaela Kaldenbach        |
| Adresse             | Neupforte 2c, 52062 Aachen |
| Familienstand       | ledig                      |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                    |
| Geburtsdaten        | 27.09.1981 in Aachen       |

### Promotion

|           |                                                                                                                                                                                                  |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| seit 2007 | Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Innere Medizin III (Gastroenterologie, Stoffwechselerkrankungen und Internistische Intensivmedizin) der medizinischen Fakultät der RWTH Aachen |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

### Schulische Ausbildung/Studium

|             |                                                               |
|-------------|---------------------------------------------------------------|
| 2001 – 2007 | Studium der Biologie an der RWTH Aachen,<br>Abschluss: Diplom |
| 1992 – 2001 | St. Ursula Gymnasium Aachen,<br>Abschluss: Abitur             |
| 1988 – 1992 | Gemeinschafts Grundschule Roetgen                             |



