

Aus der Sektion Molekulare Hepatologie
der II. Medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Sektionsleiter: Prof. Dr. rer. nat. Steven Dooley

Behandlung von Leberfibrose und Leberschädigung bei Mäusen mit
humanen mesenchymalen Hautstammzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Vanessa Annette Hartwig
aus
Mannheim
(2021)

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Steven Dooley

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	3
1.1 Die Rolle der Leber im Organismus	3
1.2 End-stage-liver-disease/ Fibrose	3
1.3 Therapieoptionen	4
1.3.1 Lebertransplantation	5
1.3.2 Stammzellen	6
1.4 ABCB5+ Zellen	8
1.4.1 Entdeckung	8
1.4.2 Vorkommen und Anwendungsgebiete	9
1.5 Das Mdr2KO Mausmodell	11
1.5.1 Hintergrund	11
1.5.2 Alter der Mdr2KO Mäuse	12
1.6 Ziel der Arbeit	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Materialien	13
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	14
2.1.3 Instrumente	16
2.1.4 Puffer und Lösungen	18
2.1.5 Kommerzielle Kits	19
2.1.6 Antikörper	20

2.2	Methoden	20
2.2.1	ABCB5+ mesenchymale Stroma- Zellen	20
2.2.2	Tiermodell und Behandlungen.....	21
2.2.3	Immunsuppression der Mdr2KO Mäuse mittels Tacrolimus	22
2.2.4	Injektion der ABCB5+ Zellen	24
2.2.5	Probenentnahme	25
2.2.6	Analyse der Leberwerte im Plasma	25
2.2.7	RNA Isolation aus Lebergewebe und reverse Transkription.....	26
2.2.8	Real-time PCR.....	26
2.2.9	Immunhistochemie (IHC).....	28
2.2.10	Hydroxyprolin-Gehalt.....	31
2.2.11	TUNEL Assay	31
2.2.12	Statistik.....	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Toxizität der ABCB5+ Zellen im Mdr2KO Mausmodell.....	33
3.1.1	Aussehen und Verhalten der Mäuse	33
3.1.2	Körper- und Lebergewicht der Mdr2KO Tiere.....	33
3.2	Geringer Einfluss der ABCB5-Zellbehandlung auf leberspezifische Enzyme und Parameter im Plasma.....	35
3.3	Verbesserung der Leberfibrose im Mdr2KO Mausmodell durch ABCB5+ Zellen.	37
3.3.1	Reduktion des Kollagengehalts in fibrosespezifische Färbungen ABCB5+ behandelte Mdr2KO Mäuse.....	37
3.3.2	Unveränderter Hydroxyprolingehalt der Leber bei Gabe von ABCB5+ Zellen.....	39
3.3.3	Einfluss der ABCB5+ Zellbehandlung von Mdr2KO Mäusen auf Gene der Fibrogenese	40

3.4	Keine Aktivierung der hepatischen Sternzellen in <i>isMdr2KO</i> Mäusen.....	42
3.5	Inflammatorische Antwort auf ABCB5+ Zellen	44
3.5.1	Reduktion inflammatorischer Infiltrate in <i>Mdr2KO</i> Mäusen ohne Immunsuppression mit ABCB5+ Zellen	45
3.5.2	Veränderung der inflammatorischen Genexpression nach ABCB5-Zellgabe in <i>isMdr2KO</i> Mäusen	48
3.6	Proliferation der Leberzellen auf ABCB5+ Zellen	50
3.7	Apoptotische Veränderungen bei Behandlung mit ABCB5+ Zellen	53
4	DISKUSSION	54
4.1	<i>Mdr2KO</i> Mäuse als Modell für Stammzelltherapie in biliärer Fibrose	54
4.2	Reduktion fibrotischer Parameter mit ABCB5+ Behandlung in <i>Mdr2KO</i> Mäusen	56
4.3	Inflammatorische Antworten auf ABCB5+ Zellen der <i>Mdr2KO</i> Mäuse	58
4.4	Das Immunsuppressivum Tacrolimus und der Effekt von Proliferation und Apoptose	60
4.5	Positive ABCB5 Zellen im chronischen Leberschaden.....	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	63
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	64
7	TABELLENVERZEICHNIS	73
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	74
9	LEBENS LAUF	76
10	DANKSAGUNG	77

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABCB5	ATP- Binding-Kassetten P-Glykoprotein, Unterfamilie B, Teil 5
ACLF	akut-auf-chronisches-Leberversagen
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
ASH	alkoholische Steatohepatitis
AST	Aspartat- Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
CCl ₄	Tetrachlormethan
d	Tage (days)
DAB	Diaminobenzidin
ECM	Extrazelluläre Martix (extracellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GLDH	Glutamatdehydrogenase
GMP	Gute Herstellungspraxis (Good Manufacturing Practice)
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HSCs	hepatische Sternzellen
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
kg/g/mg	Kilogramm/ Gramm/ Milligramm
LSC	limbale Stammzellen
Mdr2	Multidrug Resistenz Gen 2
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MSCs	mesenchymale Stromazellen
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalzlösung
NASH	nichtalkoholische Steatohepatitis
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	Programmiertes Zeltod-1 Protein
rpm	round per minute

PSC	Primäre sklerosierende Cholangitis
SD	Standardabweichung
TG	Triglyzeride
Timp1	Metallopeptidase Inhibitor 1
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
α SMA	Alpha- Smooth Muscle Actin

1 EINLEITUNG

1.1 Die Rolle der Leber im Organismus

Die Leber ist in nahezu jedem Organsystem beteiligt, vor allem in Stoffwechselprozessen. So kann sie den Körper von endogenen und exogenen Stoffen entgiften, ist an der Verstoffwechslung aller Nahrungsbestandteile beteiligt und schützt den Körper durch verschiedene Abwehrmechanismen, um nur ein paar wenige Aufgaben der Leber zu nennen. Somit hat eine Leberschädigung eine große Relevanz auf den gesamten Körper als Organismus (Leipziger, 2021).

1.2 End-stage-liver-disease/ Fibrose

Unter Leberfibrose versteht man einen potenziell reversiblen Wundheilungsprozess (Trautwein et al., 2015), der durch einen chronischen Leberschaden entsteht, verursacht durch Inflammation und immunregulierte Mechanismen (Weiskirchen and Tacke, 2016, Pellicoro et al., 2014), die in eine Dysbalance geraten (Weiskirchen and Tacke, 2016). Ursachen des Leberschadens sind multifaktoriell, weltweite Gründe sind virale Infektionen wie Hepatitis B und C, Schistosomiasis und vor allem in Europa die alkoholinduzierte Fettleber (ASH), auch als Steatosis hepatis bezeichnet, und die nicht-alkoholinduzierte Fettleber (NASH), sowie Autoimmun- und biliäre Erkrankungen (Schuppan, 2015).

In vielen Situationen ist die Leber mehr als jedes andere Organ in der Lage auf einen Schaden mit Gewebeheilung zu reagieren (Pellicoro et al., 2014). Vor allem akut kann die Leber sehr gut auf den Schaden reagieren und sich schnell wieder regenerieren (Nicolas et al., 2016, Lee and Friedman, 2011, Bataller and Brenner, 2005). Die Antwort auf einen chronischen Schaden beruht auf Nekrose, Nekroptose und Apoptose vor allem der Hepatozyten und dem Ersetzen des geschädigten Parenchyms durch extrazelluläre Matrix (ECM) (Haldar et al., 2016). Der Zelltod aktiviert inflammatorische und pro-fibrotische Signalwege in nicht-parenchymalen Leberzellen und das Organ wird von Immunzellen infiltriert (Bataller and Brenner, 2005, Lee and Friedman, 2011, Pinzani and Macias-Barragan, 2010). Meist triggern diese Prozesse das Fortschreiten der Leberfibrose, allerdings können diese auch zur Auflösung der Fibrose führen.

Der genaue Pathomechanismus ist bis heute noch nicht vollständig geklärt (Zhang et al., 2016), aber mögliche Hauptakteure werden immer besser verstanden und so ist es zur Aufgabe der Wissenschaft geworden, Schlüsseltherapeutika anhand der neuen Erkenntnisse zu finden (Friedman et al., 2013, Schuppan and Kim, 2013, Torok, 2008, Trautwein et al., 2015, Mehal and Schuppan, 2015).

Der massive Überschuss (Tacke and Trautwein, 2015) und der limitierte Umbau der ECM, die von einer massiven Anhäufung von extrazellulären Proteinen wie Proteoglykanen und Kohlenhydraten gekennzeichnet sind, führen zu Narben, Fibrose und einer veränderten Angiogenese. Dies führt schließlich zur Leberzirrhose, bei der eine zehnfache Erhöhung der Kollagene in der ECM vorliegt (Schuppan, 2015, Schuppan and Afdhal, 2008). Das sorgt für eine höhere Morbidität und Mortalität, da diese Prozesse zum Leberversagen führen (Bataller and Brenner, 2005).

Die am meist geeignete Therapie wäre, die Fibrogenese zu verhindern und somit den Prozess der chronischen Schädigung bis hin zum Leberversagen zu stoppen (Schuppan, 2015). Dies ist bis jetzt leider nur in vereinzelten Studien möglich.

Deswegen führt die Leberfibrose nach mehreren Jahren ohne Therapie definitionsgemäß zu einer Zirrhose. Dabei stehen der Verlust des gesunden Leberparenchyms und der knotige Umbau von proliferativen Hepatozyten sowie die Bildung fibrotischer Septen im Vordergrund, was den Funktionsverlust des Organs verursacht (Rappaport et al., 1983, Pellicoro et al., 2014, Iredale, 2007). Dies kann weitergehend zu einer portalen Hypertension und hepatischer Enzephalopathie führen und erhöht wesentlich das Risiko, an einem hepatozellulären Karzinom (HCC) zu erkranken, was schließlich zu Organversagen und Tod führen kann (Schuppan and Afdhal, 2008, Pinzani, 2015, Tacke and Trautwein, 2015). Die Diagnose Zirrhose bringt die Medizin schnell ans Ende ihrer Therapiemöglichkeiten (Weiskirchen and Tacke, 2016, Pinzani, 2015, Zhang et al., 2016). Eine Zeit lang ist man sogar davon ausgegangen, dass der zirrhotische Umbau der Leber irreversibel ist. Neue Studien gehen jedoch von einem bidirektionalen Prozess aus (Fallowfield et al., 2007), wobei eine vollständige Erholung der Leber sogar möglich ist (Ellis and Mann, 2012).

1.3 Therapieoptionen

Die verschiedenen Mechanismen der Entstehung von Leberschäden werden heute immer besser verstanden und man versucht mit unterschiedlichen Therapeutika an die Prozesse der Krankheitsprogression und deren Trigger anzuknüpfen und eine

Reversibilität und Heilung des Leberschadens hervorzurufen (Zhou et al., 2014). Dies ist jedoch bisher nur mit einer Lebertransplantation möglich. Neben antifibrotischen oder entzündungshemmenden Therapeutika sind auch neue Zelltherapien sehr vielversprechend (Margini et al., 2014).

1.3.1 Lebertransplantation

Bis heute ist die orthotope Lebertransplantation, d.h. die Übertragung eines Organs an die ursprüngliche anatomische Lage, die einzig effektive Therapie für Lebererkrankungen im Endstadium (Schuppan and Afdhal, 2008, Song et al., 2014). Siebzehn Haupterkrankungen der Leber waren 2018 verantwortlich dafür, dass Patienten auf die Warteliste für eine Transplantation aufgenommen wurden. Die alkoholische Leberkrankheit, Fibrose und Zirrhose waren mit Abstand die häufigsten Gründe dafür (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2018). Jedoch ist das Verfahren der Transplantation mit vielen negativen Aspekten belegt. Die Zahl der Organspender ist deutlich kleiner als die der Patienten auf der Warteliste; 2018 wurden 1.177 Neuanmeldungen bei insgesamt 877 Lebertransplantationen vermeldet (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2018) (Abbildung 1). Dabei gehen die Patienten während der Operation, durch Abstoßungsreaktionen oder immunsupprimierender Medikamenten ein hohes Mortalitätsrisiko ein, bei dem nicht sichergestellt werden kann, dass die Grunderkrankung geheilt oder keine neue Lebererkrankung auftreten kann (Francoz et al., 2007). Dabei liegt die Prävalenz der Lebertransplantierten, nach fünf Jahren eine Fibrose zu entwickeln, bei 65 % (Scheenstra et al., 2009). Neben dem direkten Risiko der Patienten muss auch der Langzeiterfolg betrachtet werden, da in 75 % der Fälle die transplantierte Leber nach einem Jahr und nur noch 55 % nach fünf Jahren nach Transplantation ihre Funktion erfüllt (Deutsche Stiftung Organtransplantation, 2018).

Aus diesen Gründen sind alternative Therapien für die erkrankten Patienten von großer Bedeutung, denn viele Patienten erfüllen schon zu Beginn nicht die Kriterien für eine Lebertransplantation und haben zurzeit keine Therapieoption (Alali et al., 2006).

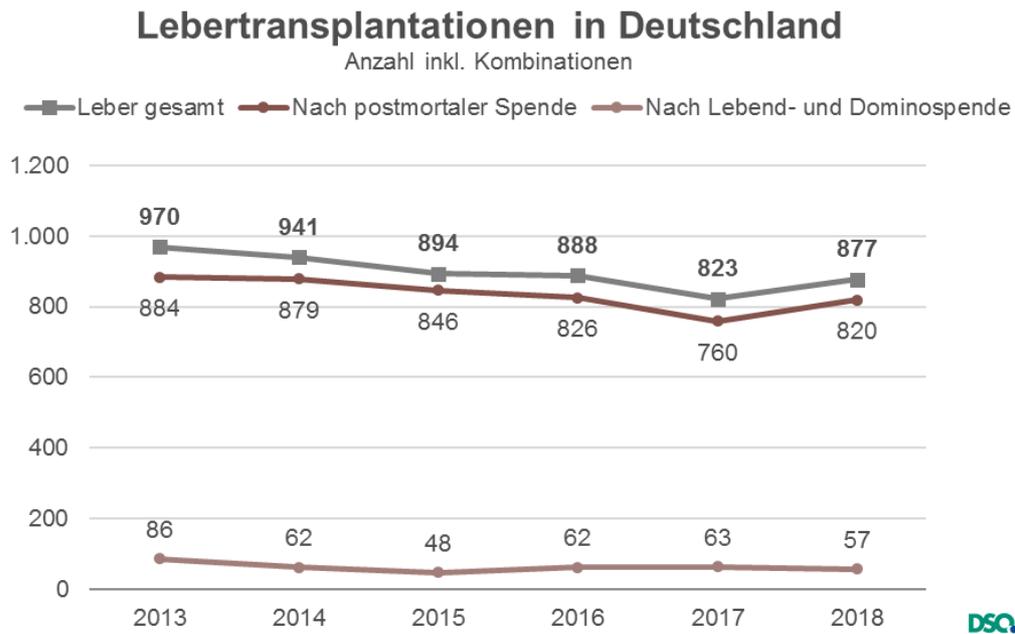


Abbildung 1.3.1: Lebertransplantationen der letzten fünf Jahre in Deutschland.
(Quelle: Autor, Jahr, www.dso.de Abrufdatum: 23.07.2019)

1.3.2 Stammzellen

Für die wartenden Patienten könnte eine bestimmte Population von Zellen eine mögliche Therapieoption darstellen. Schon vor über 130 Jahren wurden Stammzellen im Knochenmark von dem deutschen Pathologen Cohnheim entdeckt und für den Ursprung der Fibroblasten gehalten (Prockop, 1997). Dies wurde 1968 von Friedenstein bestätigt, der die Zellen isolierte und erkannte, dass sich diese Zellen in mesenchymale Stromazellen (MSC) differenzieren (Friedenstein et al., 1968). 2006 wurde von der internationalen Gesellschaft für zelluläre Therapie definiert, welche Eigenschaften die Zellen haben müssen, um als MSCs zu gelten. MSCs sind spindelförmige, formbar-anheftende Zellen, die sich durch ihre Oberflächenproteine unterscheiden. Sie müssen ähnliche Expressionsprofile nachweisen, mehr als 95 % der MSC-Population muss CD105, CD73 und CD90 exprimieren und es darf nur weniger als 2 % CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA Klasse II nachgewiesen werden. Die Zellen besitzen die besondere Eigenschaft, sich selbst erneuern zu können, und haben somit ein hohes Proliferationspotenzial (Dominici et al., 2006). Des Weiteren müssen sich die Zellen in drei unterschiedliche Zelltypen differenzieren können, in Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten. Da die MSCs nur 0,001- 0,01 % der Knochenmarkszellen ausmachen (Gronthos et al., 2003), hat man sich auf die Suche nach anderen

Ursprungsorten begeben und wurde in vielen Geweben, wie beispielsweise in der Synovialmembran (De Bari et al., 2001), in fast allen fötalen Geweben, wie im Fruchtwasser (Antonucci et al., 2011) und in der Plazenta (Fukuchi et al., 2004) fündig. Zellen des Knochenmarks, des Fettgewebes (Zuk et al., 2001) und der Nabelschnur (Lee et al., 2004) haben sich jedoch als Ursprungsgewebe durchgesetzt (Meier et al.). MSCs können sich sowohl in die oben genannten Zielzellen differenzieren, Zell-zu-Zell Kontakt aufnehmen als auch parakrin wirken (Alfaifi et al., 2018) (Abbildung 2).

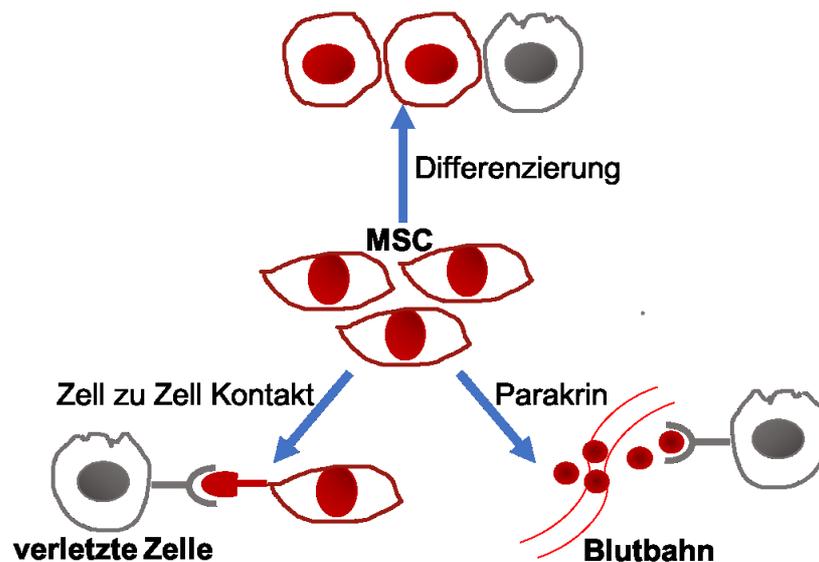


Abbildung 1.3.2: Mechanismen von MSCs. MSCs können sich sowohl in Zielzellen differenzieren, sich durch einen Zell zu Zell Kontakt verbinden oder durch parakrine Botenstoffe die verletzten Zellen erreichen. (Quelle modifiziert von (Alfaifi et al., 2018))

Mit diesem Potenzial wurden die MSCs in vielen Erkrankungen als Therapieoption getestet. Besonders hervorzuheben sind dabei Graft-versus-host-Reaktionen, Herzerkrankungen, Krebserkrankungen und Autoimmunerkrankungen (Campbell et al., 2015). Sie sind zum Teil bereits als erfolgsversprechende Therapeutika in klinischen Studien getestet. Allerdings müssen noch die genauen Rahmenbedingungen der Therapie geklärt werden, wie die genaue Anzahl der Zellen, die korrekte Gabe oder die Haltbarkeit entnommener Stammzellen. Auch die nur teilweise stattfindende Migration und die Umstände des Risikos einer möglichen Onkogenese (Alfaifi et al., 2018, Berardis et al., 2015) sind noch nicht eindeutig geklärt.

Generell sind die Zellen zu heutigen Erkenntnissen als sicher einzustufen, besonders die adulten MSCs sind den embryonalen Stammzellen ethisch überlegen und weisen

ein geringeres Onkogenitätsrisiko auf (Prockop et al., 2010). Die adulten Stammzellen sind multipotent. Das bedeutet, sie können sich nur noch in bestimmte Gewebetypen differenzieren. Die embryonalen Stammzellen sind dagegen omnipotent und entwickeln sich in alle Zellformen, was das höhere Entartungsrisiko erklärt.

Sowohl im akuten als auch im chronischen Leberschaden haben sich die MSCs schon anderen Zelltherapien als überlegen gezeigt (Meier et al., 2013), wie in ihrer metabolischen und trophischen Unterstützung als auch in ihrer Kapazität, sich in Hepatozyten zu differenzieren und anti-inflammatorische, anti-apoptotische, immunregulierende und pro-proliferative Faktoren auszuschütten (Christ et al., 2015). Die Zellen konnten ein Fortschreiten des Leberzelluntergangs verhindern und die Leber durch parakrine hepatoprotektive Effekte stimulieren (Liu et al., 2015, Tang et al., 2015, Tan et al., 2014). Beispielsweise konnte bei Mäusen mit Leberfibrose, verursacht durch das Toxin Tetrachlormethan (CCl₄) gezeigt werden, dass aus Knochenmark gewonnene MSCs durch systemische Gabe in die Leber einwandern und die Vernarbung der Leber reduzieren können und den Regenerationsprozess vorantreiben (Sakaida et al., 2004). Auch die Verbesserung der Leberfibrose an Patienten zeigt vielversprechende Ergebnisse im Hinblick auf die Lebensqualität und Leberfunktion (Eom et al., 2015).

1.4 ABCB5+ Zellen

1.4.1 Entdeckung

2003 hat die Arbeitsgruppe Frank et. al eine neue Untergruppe von Hautzellen isoliert, die durch die Expression des Adenosintriphosphat-(ATP)-Binding-Kassetten P-Glykoproteins, Unterfamilie B, Teil 5 (ABCB5) charakterisiert ist (Frank et al., 2003). Diese Zellen spielen eine Rolle bei der Differenzierung und Zellfusion, da sie das Membranpotenzial regulieren.

Humane ATP-Binding-Kassetten (ABC) bestehen aus 49 Mitgliedern und teilen sich in sieben Unterfamilien auf, ABCA-ABCG. Diese Membranproteine sind Bestandteile des Transports verschiedener Substrate wie Lipiden, Zuckern oder Chloriden (Dean and Allikmets, 2001). P-Glykoproteine mit ABC werden von Progenitorzellen exprimiert. Dies sind somatische Vorläuferzellen mit dem Potenzial zur Differenzierung. ABCB5 markiert z.B. CD133+ Progenitorzellen (Frank et al., 2003),

die multipotente, mesenchymale Eigenschaften von Stromazellen aufweisen (Vander Beken et al., 2019).

ABCB5+ Zellen befinden sich im Stratum reticulare der Dermis (Schatton et al., 2015) zwischen Fibroblasten und unter Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen der Haut (Frank et al., 2003) und machen einen 1,5 - 4 prozentigen Anteil der dermalen Zellen aus. Sie exprimieren MSC Marker, wie z.B. CD29, CD44, CD73, CD105 und CD166 in mehr als 90 % der Zellen (Schatton et al., 2015), jedoch keine hämatopoetischen oder dendritischen Marker wie CD34, CD31 oder CD45.

Nach Entnahme des Hautgewebes werden ABCB5+ Zellen durch einen spezifischen Antikörper mit einem magnetischen Separationssystem isoliert. Dabei ist eine Reinheit von mehr als 90 % durch eine Durchflusszytometrie garantiert. Auch in der Zellkultur haben die Zellen die Kapazität ihre Eigenschaften zu erhalten und sich klonal selbst zu erneuern (Vander Beken et al., 2019). Die Isolation der Zellen erfolgt nach *Guter Herstellungspraxis* (GMP) meist durch großzügig entfernter Haut bei Operationen wie der Abdominoplastik oder durch Entnahme eines ca. 5 cm² großen Hautstückchens und sie können nach ausreichenden Sicherheitsstudien unterschiedlicher Applikationsformen, z. B. subkutan, intramuskulär oder intravenös, als sicher gewertet werden (Tappenbeck et al., 2019).

1.4.2 Vorkommen und Anwendungsgebiete

ABCB5+ Zellen können vor Hautkrankheiten schützen, wie bei einem Mausmodell für rezessive dystrophe Epidermolysis bullosa, die durch neutrophile Granulozyten ausgelöst wird und die Mortalität verringert (Jiang et al., 2016, Webber et al., 2017, Riedl et al., 2021). Auch nichtheilende, chronische Ulcera können *in vitro* und in klinischen Studien durch die topische Gabe verbessert werden. (Vander Beken et al., 2019, Kerstan et al., 2020). ABCB5+ Zellen kommen nicht nur in der Haut vor, sie sind auch ein Teil der limbalen Stammzellen (LSC) im Auge (Ksander et al., 2014, Gonzalez et al., 2018). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen ohne LSCs die Kornea durch ABCB5+ LSC-Transplantation vollständig ersetzt werden konnte und die Blindheit der Tiere aufgehoben wurde (Ksander et al., 2014). Auch verlängerten die Zellen das Transplantatüberleben des Herzens durch immunregulatorische Effekte und verhinderten die Proliferation der T-Zellen durch das programmierte Zelltod-1 Protein (PD-1) bei einem murinen Modell, bei dem eine Diskrepanz des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) vorlag (Schatton et al.,

2015). Neben den schon genannten Lokalisationen konnten ABCB5+ mesenchymale Stammzellen auch in der Plazenta gefunden werden (Volpicelli et al., 2014).

Neben dem natürlichen Vorkommen der ABCB5+ Zellen spielen die Zellen auch eine Rolle in der Tumorentstehung, bei der sie als Krebsstammzelle mit hohem Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenzial agieren (Schatton and Frank, 2008). Besonders das kutane Melanom wurde schon von diversen Arbeitsgruppen erforscht und zeigt eine Expression von CD133+ Zellen im Gegensatz zu gutartigen Nävi (Sharma et al., 2010). Besonders die Zellgruppen, bei denen vermehrt ABCB5+ Zellen vorkommen, lassen eine Chemotherapieresistenz durch proinflammatorische Zytokine erkennen (Wilson et al., 2014, Klicks et al., 2019) wie auch beim seltenen Bindehautmelanom, verursacht durch multiresistente ABCB5 Transporter (De Waard et al., 2015). Verschiedene Tumorentitäten, wie Karzinome der Haut, entstanden durch entartete Merkelzellen (Kleffel et al., 2016) oder oralem Plattenepithel (Grimm et al., 2012) und auch solide Organe wie das Kolorektale Karzinom (Wilson et al., 2011, Guo et al., 2018) weisen bei positiven ABCB5 Zellen sowohl eine Chemotherapeutikaresistenz als auch schnelles Fortschreiten der Erkrankung und eine Lebensverkürzung auf. Auch Patienten mit Leukämie sind gegenüber den üblichen Therapeutika refraktär (Yang et al., 2012, Farawela et al., 2014). Besonders der Transport von Doxorubicin, einem Zytostatikum aus der Gruppe der Antracyclin-Antibiotika, ist eingeschränkt (Frank et al., 2005). Man versucht, sich diese Erkenntnisse zunutze zu machen, indem man geeignete Therapieoptionen gegen ABCB5 findet, um so das Tumorwachstum zu verringern und die Zellen damit zu vernichten, oder man macht durch an ABCB5+ Zellen bindende Antikörper die Tumorzellen sensitiver gegenüber Therapien (Heimerl et al., 2007, Farawela et al., 2014).

Auch beim hepatozellulären Karzinom (HCC) konnten positive ABCB5 Zellen nachgewiesen werden und damit eine erhöhte Resistenz auf Chemotherapeutika (Cheung et al., 2016). Bis auf das Leberzellkarzinom weisen hepatische Zellen keine ABCB5+ Zellen auf. Bis dato ist bekannt, dass ABCB5+ Zellen sich nicht ausreichend aus noch unbekanntem Gründen *in vitro* in Hepatozyten differenzieren können, sondern nur marginale Charaktereigenschaften annehmen. Jedoch sekretieren die Zellen anti-fibrotische und immunmodulatorische Faktoren, die einen positiven Effekt auf einen Leberschaden haben können (Tietze et al., 2018).

1.5 Das Mdr2KO Mausmodell

1.5.1 Hintergrund

Um nach geeigneten therapeutischen Zielstrukturen zur Verbesserung eines chronischen Leberschadens zu suchen, wurden in der Vergangenheit viele verschiedene Tiermodelle genutzt. Der Leberschaden kann sowohl chemisch, chirurgisch, infektiös als auch durch Diäten herbeigeführt (Yanguas et al., 2016) werden. Jedoch wurden im letzten Jahrzehnt immer mehr genetisch modifizierte Tiere, z. B. Mdr2KO Mäuse genutzt, da man die funktionelle Relevanz spezifischer Signalwege und die zugrundeliegenden Erkrankungen besser versteht und so versucht, neue Arzneimittel zu finden (Popov et al., 2005).

Multidrug resistance-associated protein 2 (Mdr2) -defizienten Mäusen fehlt das P-Glykoprotein und so entsteht ein Defekt der hepatozytischen Phospholipid-Flippase, die für den Transport der Phospholipide in die Gallensäure zuständig ist. Die Folge davon ist eine Anhäufung von Gallensäuren (Popov et al., 2011), Unterbrechungen der Tight Junction und Auflösung der Basalmembran, was vor allem zu einer periportalen biliären Fibrose führt (Fickert et al., 2004).

Mdr2KO Mäuse haben bereits nach vier bis acht Wochen eine biliäre Fibrose entwickelt und im Laufe der Zeit führt dies zur Zirrhose und zu HCC (Popov et al., 2005). Dabei ist der Kollagengehalt nach acht Wochen deutlich erhöht und engt das Lumen der Gallengänge erheblich ein (Mauad et al., 1994). Mdr2 entspricht dem humanen MDR3-Gen, welches bei einem Mangel bei Menschen zur progressiven familiären intrahepatischen Cholestase des Typ 3 und anschließend zu einer Leberzirrhose führt (Jacquemin, 2001). Das Modell entwickelt einen ähnlichen Phänotyp der biliären Fibrose wie bei der primären sklerosierenden Cholangitis (Popov et al., 2005), die von nekrotisierenden Hepatozyten, portaler Inflammation und Proliferation und der Zerstörung der kleinen intra- und extrahepatischen Gallengänge gekennzeichnet ist und zu einem zirrhotischen Umbau der Leber führt. (Fickert et al., 2004, Morita and Terada, 2014).

Dieses Mausmodell wurde für diese Studie gewählt, da die Patienten mit Leberversagen häufig chronische Verläufe haben und die Ursache dafür selten nur auf einem akuten Ereignis beruht.

1.5.2 Alter der Mdr2KO Mäuse

Der Zeitpunkt der Mdr2KO Mäuse wurde so gewählt, dass die Mäuse eine ausgeprägte biliäre Fibrose, mindestens im F1 Stadium, mit porto-portalen Septen aufweisen. Diese Kriterien sind auf jeden Fall im Alter von 16 Wochen gegeben (Fickert et al., 2002, Hammad et al., 2018).

1.6 Ziel der Arbeit

Um Patienten mit fortgeschrittener Leberfibrose eine adäquate Therapie bieten zu können, ist noch viel Forschung notwendig, da viele mögliche Therapieoptionen noch keinen gewinnbringenden Erfolg erzielen konnten. Die Lebertransplantation als einzige Therapie ist nicht ausreichend, da es zu wenig Spender gibt und die Operation für Alle ein hohes gesundheitliches Risiko birgt.

Stammzelltherapien sind aufgrund zahlreicher Studien vielversprechend, allerdings gestaltet sich die Entnahme und Gabe häufig als kompliziert und schwierig.

Die leicht aus dem größten Organ, der Haut, entnommenen ABCB5+ Zellen könnten dahingegen einen Vorteil bieten.

Um das herauszufinden, wurden folgende Themen in dieser Arbeit analysiert:

- Die Verträglichkeit der ABCB5+ Zellen im Mausmodell in 16 Wochen alten Mdr2KO Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, um den kurz- und langfristigen Nutzen herauszufinden
- Der therapeutische Vorteil von zwei Injektionen der ABCB5+ Zellen im Gegensatz zu einer einzelnen Dosis
- Die Eigenschaften der ABCB5+ Zellen in immunsupprimierten Mdr2KO Mäusen im Vergleich zu immunkompetenten Mdr2KO Mäusen
- Der therapeutische Effekt der ABCB5+ Zellen auf den Leberschaden der Mdr2KO Mäuse im Hinblick auf eine Leberfibrose und eine Entzündung des Organs

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Reagenz	Katalognummer	Firma
2-Propanol 100%	675220	Carl Roth, Deutschland
3,3-Diaminobenzidin Tetrahydrochloride	D5905	Sigma-aldrich, USA
Chloramine-T Hydrat	857319	Sigma-aldrich, USA
Desoxy-Nukleosidtriphosphat (10mM dNTP mix)	R0191	Thermo Scientific Fisher, USA
Dual Endogenous Enzyme- Blocking Reagent	S2003	Agilent, USA
EDTA, Dinatriumsalz	E9884	Sigma-aldrich, USA
Ehrlich Reagenz, (4-Dimethyl- aminobenzaldehyd)	156477	Sigma-aldrich, USA
Ethanol 100% für Analysen	LC40451	Neolabs, Deutschland
Ethanol 100% für IHC	T171.4	Carl Roth, Deutschland
Ethanol 70%	K928.4	Carl Roth, Deutschland
Haematoxylin modifiziert nach Gill III	1051742500	Merck, Deutschland
HCl 36.5-38%	H1758	Sigma-aldrich, USA
Hydroxyprolin	H5534	Sigma-aldrich, USA
Isofluran	21311	WDT, Deutschland
Kochsalzlösung, 0,9%	13352450	Braun, Deutschland
Malinol	3c-242	Waldeck, Deutschland
Methanol 100%	4627.2	Carl Roth, Deutschland
Methylbutan	3927.1	Carl Roth, Deutschland
Natriumchlorid	3957.2	Carl Roth, Deutschland
Natriumlaurylsulfat (SDS)	2326.2	Carl Roth, Deutschland
Oligo dT (18) Primer	S0132	Thermo Scientific Fisher, USA

Perchlorsäure 60%	131054	AppliChem, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail	P5726	Sigma-aldrich, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	L182-50	VWR, USA
Picro-Sirius-Rot	P6744-1	Sigma-aldrich, USA
POWRUP SYBR MASTER MIX	A25918	Thermo Scientific Fisher, USA
Protease Inhibitor Cocktail	P8340	Sigma-aldrich, USA
Proteinase K	S300402-2	Agilent, USA
Reverted Aid H Minus	EP0451	Thermo Scientific Fisher, USA
Transkriptase		
RNAlater	AM7024	Ambion, USA
Roti-Histofix®	P087.1	Carl Roth, Deutschland
Streptavidin-HRP	016-030-084	Jackson Immuno Research, England
Tissue Tek O.C.T. compound	600001	Wolfgang Weckert, Deutschland
Tris	4855.5	Carl Roth, Deutschland
Tween 20 ®	1247	Neolab, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30% Lösung (w/w) in H ₂ O	H1009	Sigma-aldrich, USA
Xylol	9713.2	Carl Roth, Deutschland
Zitronensäure	C2404	Sigma-aldrich, USA
β-Mercaptoethanol	A4338	AppliChem, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Katalognummer	Firma
96-well Platte, flach	655180	Greiner, Deutschland
Alluminiumfolie Rotilabo®	1770.1	Carl Roth, Deutschland
CryoPure Rörchen 1,8 ml	72379002	Sarstedt, Deutschland
Dako Stift	S2002	Agilent, USA
Deckgläser	H877.2	Carl Roth, Deutschland
Dichtungsfolie, selbstklebend	391-1254	VWR, USA

Einbettschälchen, Cryomold standard (25x20x5 mm)	4557	Wolfgang Weckert, Deutschland
Einwegspritzen Omnifix®-F	H999.1	Carl Roth, Deutschland
Einkanal Pipette Research® plus 0,1-2,5 µl	3123000012	Eppendorf, Deutschland
Einkanal Pipette Research® plus 0,5-10 µl	3123000020	Eppendorf, Deutschland
Einkanal Pipette Research® plus 10-100 µl	3123000047	Eppendorf, Deutschland
Einkanal Pipette Research® plus 100-1000 µl	3123000063	Eppendorf, Deutschland
Einkanal Pipette Research® plus 2-20 µl	3123000039	Eppendorf, Deutschland
Einkanal Pipette Research® plus, 20-200 µl	3123000055	Eppendorf, Deutschland
Filterpapier für Einbettkassetten	094015	Kabe Labortechnik, Deutschland
Gewebe-Einbettkassetten	053702	Kabe Labortechnik, Deutschland
Rundboden-Röhrchen	352008	Falcon, England
LiH microvette	201345	Sarstedt, Deutschland
Metalldeckel für Einbettkassetten	053860	Kabe Labortechnik, Deutschland
Microtome Klingen R35	207500005	Pfm Medical, Deutschland
Papierfilter	WH10311845	Whatman, England
Parafilm	743.311	Häberle, Deutschland
Precellys Lysing Kit, 2 ml leere, verstärkte Röhrchen	Kt03961-1-403.2	Bertin Technologies, Frankreich
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	30121023	Eppendorf, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	30120086	Eppendorf, Deutschland
Safe-Lock Tubes 2,0 ml	30123344	Eppendorf, Deutschland
SuperFrost®/Plus	H867.1	Carl Roth, Deutschland
Adhäsionsobjektträger		

Vicryl 6-0 Nahtmaterial	V134H	Ethicon, USA
XCEED Nitrilhandschuhe S (Puderfrei)	XC-INT-S	Starlab, Deutschland
Zentrifugierröhrchen 15 ml	188271	Greiner, Österreich
Zentrifugierröhrchen 50 ml	210.261	Greiner, Österreich

2.1.3 Instrumente

Gerät	Katalognummer	Firma
-20°C Gefrierschrank		Liebherr, Schweiz
-80°C Gefrierschrank	MDF-DU500VH-PE	Panasonic, Japan
4°C Kühlschranks	KDR4000	Bosch, Deutschland
Digitale 5-Megapixel Farbmikroskopkamera mit aktivem Kühlungssystem DFC450 C	12730222	Leica Microsystems, Deutschland
Geheizte Paraffineinbettungsstation - HistoCore Arcadia H	14039354090	Leica Biosystems, Deutschland
Halbautomatisches Rotations- Mikrotom RM2245	14050138178	Leica Biosystems, Deutschland
Inkubator Heracell 150		Heraeus, Deutschland
Inverses Kontrastmikroskop DM IL	11521228	Leica Microsystems, Deutschland
Kälteplatte HistoCore Arcadia C	14039353599	Leica Biosystems, Deutschland
Kälteplatte für Paraffineinbettungen EG1150 C	14038838037	Leica Biosystems, Deutschland
Klinisch-chemischer Analyser Cobas C311	1182-14	Roche, Schweiz
Konfokales Mikroskop TCS SP8y	DM6000	Leica, Deutschland
Homogenisator T10 basic ULTRA-TURRAX®	0003737000	IKA, Deutschland

Magnetrührer, beheizt, RCT basic	0003810000	IKA, Deutschland
Microskop Leica DMRE	TYPE 020-525.025	Leica Microsystems, Deutschland
Mikrowelle	MW17M70-AU	Midea, China
PCR-Cycler PeqStar Universal 96 Well-Platte	95-07002	Peqlab, Deutschland
PRECELLYS®EVOLUTION Homogenisator	EQ02520-300-RD000/ 300-0204	Peqlab, Deutschland
Präzisionswaage Sartorius R200 B		Sartorius, Deutschland
Wasserreinigungssystem PureLab Flex mit UV	PF1XXXXM1	ELGA, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	4376600	Applied biosystems®, USA
Tecan Infinite® M200 Mikroplattenlesegerät mit Nano Quant Platte	30016056	Tecan, Schweiz
Thermoblock ThermoStat plus	5383000019	Eppendorf AG, Deutschland
TP1020 halb-geschlossener Tisch-Gewebeprozessor	Leica TP1020	Leica Biosystems, Deutschland
TurboVap® Classic LV	TV1652N21783	Biotage, Schweden
Waage Sartorius BP 4100		Sartorius, Deutschland
Wippschüttler Duomax 1030	543-32205-00	Heidolph, Deutschland
Reagenzglasschüttler VM3	60203-00	CAT, M. Zipperer GmbH, Deutschland
Wasserbad für Paraffingewebe	25900	MEDAX GmbH&Co. KG, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo R	75005440	Heraeus, Deutschland
Zentrifuge 5418	5418	Eppendorf, Deutschland

2.1.4 Puffer und Lösungen

Angesäuertes Wasser

- 5 ml Essigsäure
- 1 l Wasser

Chloramin-T Lösung

- 840 µg Chloramin-T
- 60,5 µl Chloramin-T Puffer
- 39,5 µl 100 % Isopropanol

Chloramin-T Puffer (pH 6,0)

- 42 ml Natriumacetat
- 3,6 ml 1M Zitronensäure
- 800 ml destilliertes Wasser
- pH-Wert einstellen auf 6,0
- Auf 1 l auffüllen

10mM Citrat Puffer (pH 6,0)

- 1,92 g Zitronensäure
- 800 ml destilliertes Wasser
- pH-Wert einstellen auf 6,0 mit 1N HCl
- 0,5 ml Tween 20
- Auf 1 l auffüllen

DAB Puffer (pH 7,6)

- Tablette DAB
- Aufgelöst in 15 ml 0,05M Tris Puffer
- pH-Wert auf 6,0 einstellen und filtern

1mM EDTA Puffer (pH 8,0)

- 0,37 g EDTA
- 800 ml destilliertes Wasser
- pH-Wert einstellen auf 8,0
- 0,5 ml Tween 20
- Auf 1 l auffüllen

Ehrlich's Reagenz

- 124 mg Ehrlich's Reagenz (=4-Dimethyl-Aminobenzaldehyd)
- 135 µl 60 % Perchlorsäure
- 365 µl 100 % Isopropanol

- | | |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS (20x) | <ul style="list-style-type: none"> • 191 g PBS • 1 l destilliertes Wasser • Die Stammlösung wurde zur Benutzung 1:50 mit destilliertem Wasser verdünnt |
| Picro-Sirius-Rot Lösung | <ul style="list-style-type: none"> • 0,5 g Sirius Rot F3B (C.I. 35782) • 500 ml gesättigte Lösung von Pikrinsäure |
| Tris Puffer (pH 0,05) | <ul style="list-style-type: none"> • 3,0285 g Tris • 400 ml destilliertes Wasser • pH-Wert einstellen auf 7,6 • auf 500 ml auffüllen |

2.1.5 Kommerzielle Kits

<i>Kit</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
Avidin-Biotin-System	ab64212	Abcam
In-situ cell death detection kit, Fluorescein	11684795910	Roche, Deutschland
InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit	1060100300	Stratec, Deutschland
• lysis buffer	1060101700	
• washing buffer 1	1060103500	
• washing buffer 2	1060103600	
• elution buffer	1060104100	

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 Primäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
αSMA	m0851	Dako
CD163	ab182422	Abcam
CD45	550539	BD Bioscience
F4/80	MCA497R	Biorad
KI-67	12202s	Cell signaling
SM22α	ab14106	Abcam

2.1.6.2 Sekundäre Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Katalognummer</i>	<i>Firma</i>
Anti-mouse IgG HRP	p0447	Dako
Anti-rabbit HRP	IMMRIR2932	Immunoreagents
Biotinylated Anti-Rabbit IgG	ab6720	Abcam
Biotinylated Anti-Rat IgG	BA-9400	Vector Lab

2.2 Methoden

2.2.1 ABCB5+ mesenchymale Stroma- Zellen

Zur Isolation von ABCB5+ Zellen wird 5 cm² Haut von humanen Spendern entnommen und in der Firma TICEBA GmbH (Heidelberg) aufbereitet. Dabei wird die Haut an unauffälligen Stellen, z. B. hinter dem Ohr oder bei Operationen wie einer Abdominoplastik entfernt. Die Entnahme erfolgt nach den Prinzipien der Deklaration von Helsinki, in denen die ethischen Richtlinien der medizinischen Forschung des Weltärztebundes festgehalten sind. Der Tierantrag wurde vom Regierungspräsidium in Karlsruhe unter dem Aktenzeichen 35-9185.81 genehmigt.

2.2.1.1 Aufbereitung

Die Hautzellen werden direkt nach der Isolation mittels anti-CD133 Antikörper-beschichteten magnetischen Microbeads und nach Inkubation mit einem anti-ABCB5

monoklonalen Antikörper an magnetisch aktivierten Zell-Separationssäulen sortiert (MACS) (Frank et al., 2003).

2.2.2 Tiermodell und Behandlungen

2.2.2.1 Mdr2 Knockout-Mäuse (Mdr2KO)

Es wurden 16 Wochen alte Mdr2KO Mäuse mit Hintergrund des Balb/c Stammes beider Geschlechter genutzt. Diese wurden von Prof. Frank Lammert (Universität des Saarlandes) bereitgestellt (Lammert et al., 2004). Die Tiere wurden in spezifisch-pathogener Umgebung, im 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten und *ad libitum* ernährt. Die Genotypisierung wurde mittels Schwanzspitzen der Mäuse und folgender Primer- Paare durchgeführt (Mauad et al., 1994, Pikarsky et al., 2004):

Vorwärts: 5'-GCTGAGATGGATCTTGAG-3',

Rückwärts: 5'-GTCGAGTAGCCAGATGATGG-3'.

2.2.2.2 Behandlungsstrategien

Die behandelten Gruppen und die Kontrollen wurden zufällig gewählt, in Gruppen von n=4-8 Tieren aufgeteilt und in drei unterschiedliche Versuche unterteilt (Abbildung 3).

In *Gruppe 1* erhielten die zuvor immunsupprimierten Mdr2KO Mäuse zwei Tage nach Transplantation der Pumpen eine einmalige Injektion von entweder 100 µl 5×10^5 ABCB5+ Zellen oder 0,9 prozentiger Kochsalzlösung intravenös in die Schwanzvene. Nach zwei Tagen, zwei und vier Wochen wurden die Mäuse euthanasiert und Proben (Blut, Gewebe, RNA etc.) für weitere Analysen entnommen. Zwei Tage wurden gewählt, um eine mögliche Ansiedlung der Zellen festzustellen und die anderen Zeitpunkte, um den Langzeiteffekt der ABCB5+ Zellen zu untersuchen.

Zwei Tage nach Pumpentransplantation für die dauerhafte Immunsuppression erhielten auch die Tiere der *Gruppe 2* 100 µl 5×10^5 ABCB5+ Zellen für die Behandlungsgruppe und Kochsalzlösung für die Kontrollen in die Schwanzvene. Die gleiche Injektion wurde nach einer Woche wiederholt und eine weitere Woche später wurden die Mäuse euthanasiert und wie in *Gruppe 1* das Gewebe analysiert.

Im *Gruppe 3* erhielten Mdr2KO Mäuse eine Injektion von 100 µl 5×10^5 ABCB5+ Zellen oder Kochsalzlösung in die Schwanzvene ohne vorausgegangene Immunsuppression und wurden sechs Tage danach euthanasiert, um die Proben wie

in *Gruppe 1* und *2* zu untersuchen. Dieser Zeitpunkt wurde so gewählt, dass die Zellen ihre mögliche Wirkung entfalten können, jedoch Immunreaktionen noch erkennbar wären.

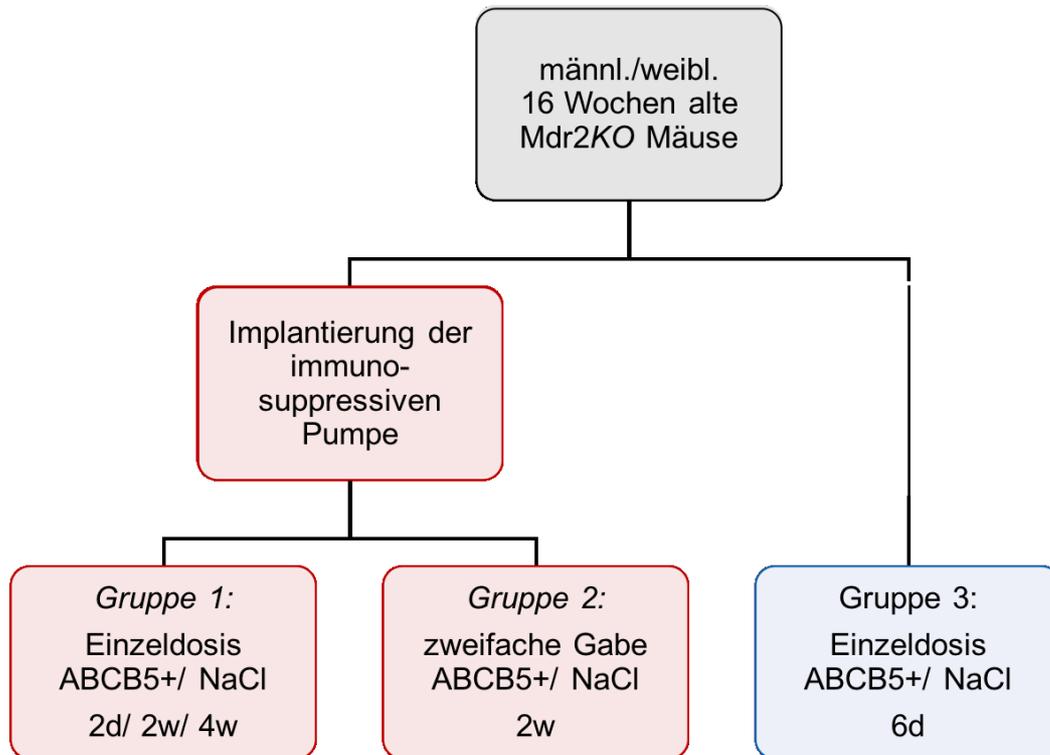


Abbildung 2.2.1: Versuchsaufbau. Die drei Gruppen der Mdr2KO Mäuse mit oder ohne Immunsuppression und einfacher und zweifacher Gabe von ABCB5+ Zellen oder NaCl bei den Kontrollen.

2.2.3 Immunsuppression der Mdr2KO Mäuse mittels Tacrolimus

Für eine mögliche Abstoßungsreaktion von humanen ABCB5+ Zellen in Mdr2KO Mäusen wurden die Tiere immunsupprimiert. Um Stress der Mäuse, mögliche Infektionen der Einspritzungsstellen oder Organperforation zu verringern, die bei täglichen Injektionen vom Immunsuppressivum entstanden wären, wurden osmotische Pumpen der Firma Alzet® (Abbildung 4) ausgewählt, die eine kontinuierliche Dosierung vom Immunsuppressivum Tacrolimus erreichen. Die Funktionsweise der Pumpe ergibt sich durch die hohe Osmolarität. Dabei wird Wasser aus der Umgebung in die Pumpen gezogen und verdrängt somit die Flüssigkeit im Inneren, in diesem Fall Tacrolimus, nach außen. Durch einen Durchflussmesser wird nur eine kontrollierte Dosis abgegeben (Theeuwes and Yum, 1976).

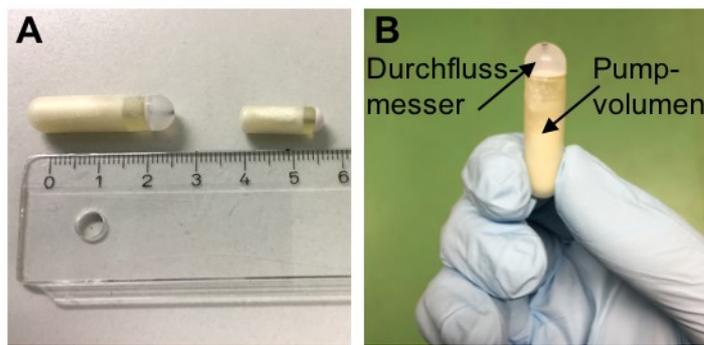


Abbildung 2.2.2: Osmotische Pumpen. (A) GröÙe der Modelle 2004 (links) und 1002 (rechts). **(B)** Pumpaufbau: Oben befindet sich der Durchflussmesser, mit einer Rate von 0,25 µl/h. Das Modell 2004 fasst 1 ml, das Modell 1002 100 µl.

2.2.3.1 Befüllung der Pumpen

Für eine maximale Dauer von 14 Tagen wurde das Modell 1002 und darüber hinaus das Modell 2004 der Alzet® Pumpen genutzt. Damit eine Konzentration von 1 mg/kg/Tag bei einem Durchschnittsgewicht von 25 mg erreicht werden konnte, wurden 5 mg Tacrolimus in 0,9 % NaCl unter sterilen Bedingungen bei Raumtemperatur gelöst und in die Pumpen mit von Alzet® mitgelieferten Spritzen befüllt. Dazu war eine Konzentration von 4,17 µg/µl bei einer Durchflussrate der Pumpe von 0,25 µl/h notwendig. Diese wurden in steriler Kochsalzlösung gelagert, um nach 24 Stunden von einer kontinuierlichen Sekretion von Tacrolimus auszugehen.

2.2.3.2 Implantation der Pumpen

Die Implantation der osmotischen Pumpen erfolgte subkutan in die Nackenfalte der Mäuse (Abbildung 5). Für die Operation wurden die Tiere zunächst gewogen, mit fünfprozentigem Isofluran mit 1 l/min O₂ narkotisiert und im Verlauf der Operation wurde die Dosis auf 3 % Isofluran mit 0,3 l/min O₂ herabgesetzt. Damit intraoperative Schmerzen vermieden werden konnten, wurde 250 µl Carprofen (5 µg/g) s.c. lateral der Nackenfalte injiziert und zum Schutz der Augen Bepanthen Augensalbe aufgetragen. Nach dem Verlust aller Reflexe wurde die Haut mit einem 0,5 cm langen Scherenschnitt in der Nackenfalte eröffnet und stumpf eine kleine Tasche in Richtung Schwanz präpariert. Die schon vorbereitete, befüllte Pumpe wurde in die Tasche platziert mit der Öffnung nach caudal. Die Wundränder wurden nach

Einbringung aneinander adaptiert und mit 2-3 Tropfen des Gewebeklebers Surgibond® verschlossen. Nach Trocknung des Klebers wurde noch eine Einzelknopfnah mit Vicryl 6-0 durchgeführt. 0,5 ml NaCl wurden s.c. am Bauch injiziert, um einen Flüssigkeitsverlust nach der Operation zu vermeiden. Zusätzlich wurden dem Trinkwasser 3-5 Tropfen Metamizol/100 ml H₂O als Schmerzmedikation hinzugefügt.

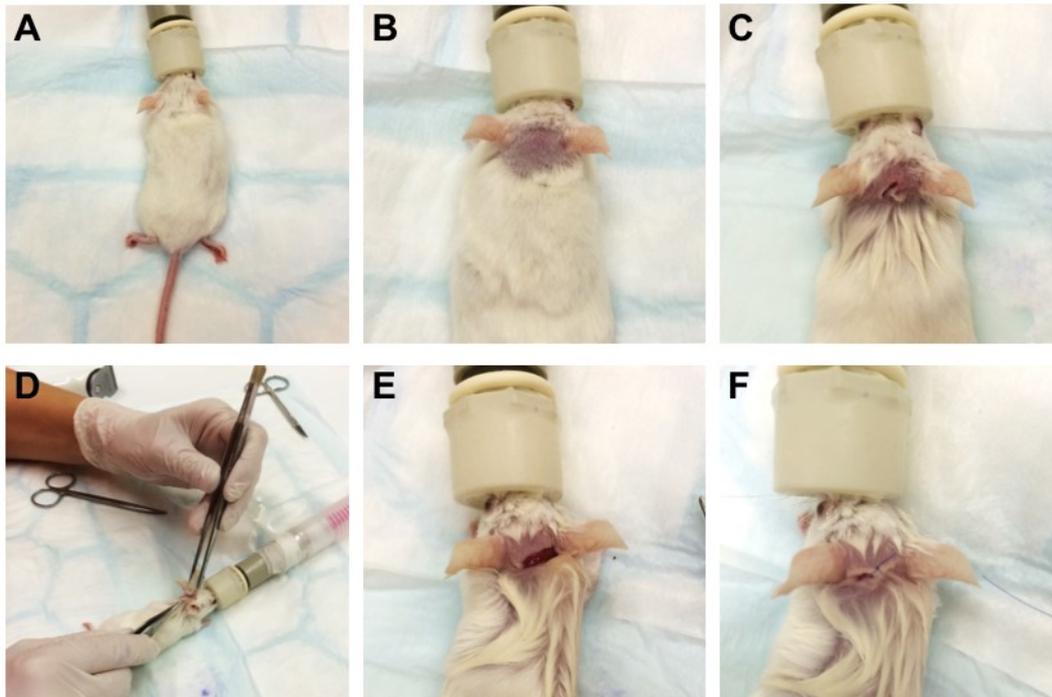


Abbildung 2.2.3: Pumpenimplantation der Mdr2KO Mäuse. (A) Maus am OP Tisch in Narkose (B) rasierter Bereich der Nackenfalte, (C) Inzision mit Taschenpräparation, (D) Implantation der befüllten osmotischen Pumpe, (E) Maus mit bereits eingelegter Pumpe, (F) Einzelnaht der Wunde.

2.2.4 Injektion der ABCB5+ Zellen

Die ABCB5+ Zellen wurden am Injektionstag von Ticeba GmbH (Heidelberg) in gebrauchsfertigen Spritzen, insgesamt 5×10^5 ABCB5+ Zellen in 100 μ l Ringer-Laktat-Lösung geliefert und nach Gewichtskontrolle der Mäuse unter dreiprozentiger Isofluran Narkose in die Schwanzvene injiziert.

Die Tiere wurden engmaschig beobachtet, täglich gewogen, nach Schmerzzeichen wie vernachlässigte Fellpflege, gekrümmte Haltung etc. untersucht, um eventuelle Abstoßungsreaktionen zu bemerken.

2.2.5 Probenentnahme

Mdr2KO Mäuse wurden gewogen, mit 3 % Isofluran narkotisiert und retrobulbär mit Kapillarröhrchen Blut abgenommen. Dieses wurde in eine Lithium-Heparin Microvette® gefüllt und direkt auf Eis gelegt. Danach wurden die Tiere mit einem Genickbruch getötet, das Fell und die Bauchhöhle eröffnet und die Leber entnommen und das Lebergewicht ermittelt. Die Gallenblase wurde entfernt und die Leberlappen für verschiedene Untersuchungen aufgeteilt:

Der linke Leberlappen wurde in vierprozentiger Formaldehydlösung für 48 h bei 4 °C fixiert. Der obere Teil des rechten Leberlappens wurde über kaltem Methylbutan gefroren und der untere Teil in Tissue-Tek® eingebettet, auf Trockeneis gelegt und bei -80 °C für Kryostatschnitte aufbewahrt. Sowohl der mediane Lappen, der linke Teil für Protein, der rechte Teil für RNA, als auch der Lobus caudatus für das Hydroxyprolin Assay wurden in kleine Stücke geschnitten, in Kryo-Gefäße gefüllt und alle bis auf das Gewebe für die RNA-Untersuchungen in flüssigem Stickstoff, später bei -80 °C gelagert. In die Röhrchen mit dem kleingeschnittenen Gewebe für RNA-Untersuchungen wurde zusätzlich 1 ml RNAlater gefüllt, diese für 24 Stunden bei 4 °C gelagert, die Flüssigkeit entfernt und mit den anderen Proben bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.6 Analyse der Leberwerte im Plasma

Das retrobulbär abgenommene Blut wurde bei 14.000 rpm für 3 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der farblose Überstand, das Plasma, in 1,5 ml Röhrchen überführt und bei -20 °C gelagert. Die Proben wurden mit dem Analyseautomaten Cobas C311 photometrisch auf Leberparameter wie Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), Alkalische Phosphatase (AP) und Laktatdehydrogenase (LDH) untersucht. Zur Aminotransferase gehören die Leberenzyme ALT und AST, die auf eine Leberzellschädigung hinweisen. ALT ist das einzig spezifische Leberenzym, da AST noch im Muskel vorkommen kann. AP ist ein Cholestaseparameter, neben Bilirubin und Gamma-Glutamyltransferase, das in mehr als 15 verschiedenen Isoformen vorkommt, z. B. auch im Darm, und somit auch nicht spezifisch ist (Vanderlaan and Phares, 1981). LDH weist auf eine Zellschädigung hin und ist z. B. bei einer Hämolyse erhöht (Rousseau et al., 2016).

2.2.7 RNA Isolation aus Lebergewebe und reverse Transkription

20 mg Lebergewebe aus dem rechten Mittellappen wurden in spezielle 2 ml Röhren mit 1,4/2,8 mm großen Keramikkügelchen (Precellys® Keramik-Kit) gegeben und mit 600 µl β-Mercaptoethanol-haltiger Lysis Solution TR (Stratec Kit) zweimal 10 Sekunden bei 5.000 rpm und einmal mit Hilfe des Precellys® Evolution Homogenisator homogenisiert. Die Proben wurden danach für fünf Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in RNase freie 1,5 ml Empfänger Röhren pipettiert. Die RNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem InviTrap® Spin Universal RNA Mini Kit isoliert. Dabei wurden die Proben zunächst mit 100 % Ethanol von anderen Rückständen befreit und durch Filter und Waschpuffer gereinigt. Um Ethanolrückstände zu vermeiden, wurden die Proben für vier Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert und die RNA wurde mit 20 µl Elutionspuffer aus dem Filter herausgelöst und in Elution Tubes überführt. Die RNA-Konzentration wurde mittels des Tecan infinite M200 Mikrotiterplattenphotometers gemessen. Dabei wurde mit 2 µl Elutionspuffer der Leerwert bestimmt und bei 280 nm die Absorption der RNA gemessen.

Mit 500 ng RNA und cDNA Synthesereagenzien wurde die reverse Transkription durchgeführt. Zuerst wurden Oligo dT (0,25 µl) und Random Primer (0,25 µl) mit der RNA und H₂O (auf 10 µl) zentrifugiert und für 5 min bei 65 °C und für 10 min bei RT inkubiert und mit Reaktionspuffer (2 µl), dNTPs (1 µl) und reverser Transkriptase (0,25 µl) gemischt und für 1 h bei 42 °C und 5 min bei 72 °C inkubiert. Danach wurde die cDNA sofort auf Eis gelegt, im Verhältnis 1:5 mit RNase freiem Wasser verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Real-time PCR

Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde mit SYBR Green durchgeführt und die Primer wurden bei Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestellt und mit RNase freiem Wasser neu konstituiert. Die verdünnte 2 µl cDNA wurde mit 1 µl Vorwärts- und 1 µl Rückwärtsprimer, 6 µl RNase freiem Wasser und 10 µl SYBR Green gemischt und mit einer selbstklebenden Dichtungsfolie bedeckt. Die RT-PCR wurde in einer 96-Well Platte im StepOne Plus Realtime PCR System gestartet. Das dafür verwendete Programm ist in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: RT-PCR Zyklus

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
1	95°C	10min	1x
2	95°C	15sec	} 40x
3	60°C	1min	
4	72°C	1min	
5	4°C	Ende	

Jede Probe wurde als Duplikat oder Triplikat mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) ausgewertet. Für die Quantifizierung wurde als Referenzgen PPIA benutzt. Bei der Anwendung wird der Schwellenwert der Fluoreszenz über dem des Hintergrundes gemessen und als Ct-Werte (cycle treshold) angegeben, wie viele Zyklen für die Messung notwendig waren. Die Ct-Werte verhalten sich umgekehrt proportional zur Menge der Nukleinsäuren. Die relative Quantifizierung wurde mit der $\Delta\Delta Ct$ -Methode ermittelt.

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Behandlung} - \Delta Ct_{Kontrolle}$$

$$Relative\ Ratio = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Um die Spezifität der Messungen zu gewährleisten, wurden Dissoziationskurven analysiert und nur Primer mit einem Dissoziationshöhepunkt ausgewählt, die in Tabelle 2.2 gelistet sind.

Tabelle 2.2: Sequenzen von Primerpaaren für die Real-time PCR

Gene	Vorwärts	Rückwärts
<i>ASma</i>	TTCGCTGTCTACCTTCCAGC	GAGGCGCTGATCCACAAAAC
<i>Col1a1</i>	ACGTGGAAACCCGAGGTATG	TTGGGTCCCTCGACTCCTAC
<i>Ctgf</i>	AGATTGGAGTGTGCACTGCCAAAG	TCCAGGCAAGTGCATTGGTATTTG
<i>Il1B</i>	CCCAACTGGTACATCAGCACCTC	GACACGGATTCCATGGTGAAGTC
<i>Il6</i>	TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>PparG</i>	TCCAGCATTTCTGCTCCACA	ACAGACTCGGCACTCAATGG

<i>Ppia</i>	GAGCTGTTTGCAGACAAAGTC	CCCTGGCACATGAATCCTGG
<i>Il1ra</i>	AGTACTGCCGAGGCCTGTAATAA	TTGTTCCCTCAGGCCCCAAT
<i>TgfB1</i>	AGGGCTACCATGCCAACTTC	CCACGTAGTAGACGATGGC
<i>Timp1</i>	CGAGACCACCTTATACCAGCG	ATGACTGGGGTGTAGGCGTA
<i>TnfA</i>	CCCTCACACTCACAAACCAC	ATAGCAAATCGGCTGACGGT

2.2.9 Immunhistochemie (IHC)

Der linke Leberlappen wurde in eine Einbettungskassette auf Filterpapier gegeben, mit einem Metalldeckel verschlossen und in Roti®-Histofix bei 4 °C fixiert. Nach 24-48 Stunden durchlief das Gewebe den Prozess der Paraffineinbettung mit dem Leica TP1020 halb-geschlossenen Tisch-Gewebeprozessor wie in Tabelle 2.3 dargestellt. Das prozessierte Gewebe wurde danach wieder in eine Einbettungskassette gegeben und mit der Paraffineinbettungsstation HistoCore Arcadia H mit Paraffin aufgefüllt. Die Paraffinblöcke wurden auf einer Kälteplatte abgekühlt (Leica Biosystems). So konnten 3 µm Gewebeschnitte mittels des halb-automatischen Rotationsmikrotoms hergestellt werden, auf anheftende Glaträger gelegt, für eine Stunde bei 60 °C getrocknet und bei Raumtemperatur im Dunklen gelagert werden.

Tabelle 2.3: Prozess der Paraffineinbettung

Lösung	Zyklen	Dauer (h)
70 % Ethanol	2	1
80 % Ethanol	1	1
95 % Ethanol	1	1
100 % Ethanol	3	1,5
Xylol	3	1,5
Paraffin Wachs (58-60 %)	2	2

2.2.9.1 Immunhistochemische Färbungen

Um die Schnitte anzufärben, wurden diese zunächst deparaffinisiert, dafür wurden die Schnitte kontinuierlich dreimal in Xylol, zweimal für fünf Minuten und einmal für 10 Minuten, fünf Minuten in 100 % Ethanol und nacheinander 10 Minuten und zum

Schluss fünf Minuten in 96 % Ethanol eingetaucht, bevor die Schnitte mit destilliertem Wasser gewaschen wurden und fünf Minuten in PBS gelagert wurden. Für die Antigen Demaskierung (Retrieval) wurden die Schnitte mit EDTA- für 10 Minuten oder Citrat Puffer für 20 Minuten bedeckt, in der Mikrowelle zum Sieden gebracht und anschließend 30 Minuten abgekühlt oder für fünf Minuten, wie bei der F4/80 Färbung, enzymatisch mit Proteinase K demaskiert. Nach dem Waschen in destilliertem Wasser und PBS wurden die Schnitte mit dem Dako Stift eingekreist, um eine vollständige Bedeckung zu gewährleisten. Die Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität für 20 Minuten wurde mit dem dualen endogenen Enzym-Blockierungs-Reagens durchgeführt und die Schnitte anschließend gewaschen (immer dreimal für fünf Minuten in PBS). Bei den Färbungen mit α SMA und SM22 α wurde der Antikörper direkt auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4 °C in Dunkelheit gelagert. Bei den anderen Färbungen wurde das Avidin-Biotin System vor dem Erstantikörper verwendet, um das Signal zu verstärken. Dafür wurden die Schnitte für 15 Minuten zunächst mit Avidin, danach mit Biotin bedeckt und dazwischen gespült. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur belassen und dreimal für fünf Minuten mit PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde für 30 Minuten aufgetragen und danach wieder abgewaschen. Die Färbungen mit Avidin-Biotin System wurden noch mit Streptavidin HRP 1:500 für 30 Minuten behandelt und gewaschen. Für die Anfärbung mit DAB wurde der DAB Puffer mit 30 % Wasserstoffperoxid aktiviert (1,6 μ l in 2 ml DAB Puffer). Das DAB bedeckte für maximal 10 Minuten die Schnitte, bei Kontrolle unter dem Mikroskop, sobald eine Färbung zu sehen war, wurde die Reaktion in destilliertem Wasser beendet. Die Zellkerne wurden anschließend mit Hämatoxylin für ca. 3 Sekunden gefärbt und danach 10 Minuten unter laufendes Wasser gestellt. Zum Schluss mussten die Schnitte noch dehydriert werden, für je 30 Sekunden durchliefen sie nacheinander zweimal 96 prozentiges Ethanol, gefolgt von zweimal 100 prozentigem Ethanol, worauf dreimal Xylol folgte. Auf die Schnitte wurde je ein Tropfen Malinol auf ein Deckglas gegeben und unter dem Leica Hellfeld Mikroskop DMRE analysiert. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Zielgruppe	Antigen-Retrieval	Primärer Antikörper (Konzentration)	Sekundärer Antikörper (Konzentration)
Proliferation	Citrat	Rabbit anti- Ki-67 (1:250)	Biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:500)
Leukozyten	Citrat	Rat anti- CD45 (1:100)	Biotinylated goat anti-rat IgG (1:500)
Fibroblasten	EDTA	Rabbit anti- SM22 α (1:100)	goat anti-rabbit HRG (1:200)
Makrophagen	Proteinase K	Rat anti- F4/80 (1:2000)	Biotinylated goat anti-rat IgG (1:2000)
Makrophagen	EDTA	Rabbit anti- CD163 (1:500)	Biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:200)
Aktivierte HSCs	EDTA	Mouse anti-human α -SMA (1:1000)	goat anti-mouse (1:200)

2.2.9.2 Picro-Sirius-Rot-Färbung (PSR)

Um den Kollagengehalt der Leber zu bestimmen, wurde die Sirius-Rot-Färbung durchgeführt (Junqueira et al., 1979, Puchtler et al., 1973). Das Cytoplasma und die Muskelfasern werden dabei gelb und die Kollagenfasern rot gefärbt. Die Deparaffinisierung der Schnitte wurde wie oben in Abschnitt 2.2.9.1 beschrieben durchgeführt. Danach wurden die Zellkerne mit Weighert's Hämatoxylin für acht Minuten angefärbt und für 10 Minuten unter laufendem Leitungswasser gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden für eine Stunde in der Picro-Sirius-Rot-Lösung inkubiert und mit angesäuertem Wasser gespült. Die Schnitte wurden wie oben beschrieben wieder dehydriert und mit Malinol und einem Deckglas bedeckt.

2.2.9.3 Quantifizierung

Die gefärbten Schnitte wurden mit 15 nicht überlappenden Bildern blind mit dem Leica Hellfeld Mikroskop DMRE bei 20-facher Vergrößerung gemacht. Repräsentativ wurden je fünf Bilder von den Portalvenen, fünf von den Zentralvenen und fünf aus periportal-Zentralvenen Bereichen quantifiziert und mit der ImageJ Software 1.49 ausgewertet (NIH, Maryland, USA). Dabei wurde das DAB Signal prozentual zum

restlichen Gewebe gemessen. Bei den Färbungen von CD45 und Ki-67 wurden die Zellkerne manuell ausgezählt.

2.2.10 Hydroxyprolin-Gehalt

Um den Kollagengehalt der Leber zu messen, wurde nach den Protokollen von (Jamall et al., 1981, Boigk et al., 1997) totales Hydroxyprolin, eine Aminosäure, die in Kollagen gebunden ist, bestimmt. Dafür wurden 100 mg gefrorenes Lebergewebe vom kaudalen Lappen in 2 ml 6N HCl in geschlossenen Reagenzgläsern für 30 Minuten bei 110 °C gelöst. Danach wurde das Gewebe für 30 Sekunden homogenisiert und für weitere 16 h bei 110 °C hydrolysiert und mittels Papierfilter gefiltert. 15 µl Probe wurde mit 15 µl Methanol in Triplikaten in 1,5 ml Eppis in einem Stickstoff betriebenen Heizblock für 30 Minuten bei 75 °C und 7 µl verdampft und anschließend mit 0,5 ml Isopropanol gelöst. Als Standard wurden verschiedene Konzentrationen von Hydroxyprolin in Isopropanol gewählt (0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,4, 1,8, 2,2, 2,6, 3,0, 3,4 µg/ml). Es wurde Chloramin-T Lösung (840 µg Chloramin-T, 60,5 µl Chloramin-T Puffer, 39,5 µl 100 % Isopropanol) hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde frisch zubereitete Ehrlich-Reagenz (124 mg Ehrlich-Reagenz (=4-Dimethyl-aminobenzaldehyde), 135 µl 60 % Perchlorsäure, 365 µl 100 % Isopropanol) gegeben und für weitere 90 min bei 50 °C inkubiert. Die Absorption wurde mit 200 µl Probe/Standard bei 558 nm colorimetrisch im Tecan Mikrotiterplattenlesegerät gemessen.

Zusammengefasst kann das freie Hydroxyprolin durch eine saure Hydrolyse und durch die Oxidierung durch Chloramin-T gemessen werden.

Evaluation: Der Blindwert wurde von allen Proben abgezogen und die Formel für die Berechnung des Hydroxyprolinegehalts durch die lineare Funktion der Standardkurve, die mittels der verschiedenen Konzentrationen von Hydroxyprolin errechnet wurde, bestimmt. Um den genauen Gehalt von Hydroxyprolin in µg/g Leber zu erhalten, wurden die errechneten Werte am Ende mit 666,7 multipliziert.

2.2.11 TUNEL Assay

Für die Detektion apoptotischer Zellen wurde das TUNEL Assay benutzt. Nach der Deparaffinisierung, wie in Kapitel 2.2.9.1 beschrieben, wurden die Schnitte für 20 Minuten in Proteinase K inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Reaktionsgemisch mit Enzymlösung und „Label-Solution“ (In-situ cell death detection kit) im Verhältnis

1:10 hergestellt. Nach dreimaligem Waschgang mit PBS für fünf Minuten wurde das Gewebe mit dem Reaktionsgemisch bedeckt und für eine Stunde bei 27 °C im Dunklen inkubiert. Die Schnitte wurden gewaschen, mit Fluorescent mounting medium und einem Deckglas bedeckt. Wieder wurden 15 Bilder mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommen und der ImageJ Software 1.49 ausgewertet.

2.2.12 Statistik

Die Größe der Gruppen wurde im Voraus mit dem Stichproben-Rechner <https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx> (Hulley et al., 2013) berechnet. Dabei wurde das Signifikanzniveau bei $p=0,05$, der Fehler der 2. Art (β -Fehler) mit 0,2 und die Standardabweichung von 1 mit einer statistischen Aussagekraft von 0,8 eingestellt. Die statistischen Berechnungen wurden aufgrund von quantifizierbaren Variablen von Fibrosemarkern ausgeführt. Verweisend auf verschiedene Studien (Luo et al., 2019, Van Der Helm et al., 2019, Bi et al., 2019) wurde eine Reduktion der Fibrose bei der PSR-Färbung um 40 % erwartet und dabei eine Zielgröße von $n=8$ errechnet. So konnte bei einem Mittelwert von 2,97 der behandelten Gruppe und 1,71 der Kontrollen bei einer Standardabweichung von 0,92 und einer statistischen Aussagekraft von 0,73 eine Reduktion von 57 % erzielt werden.

In allen Experimenten wurden die Kontrollen mit den behandelten Tieren zum gleichen Zeitpunkt verglichen. Mit dem Shapiro-Wilk Test wurde die Normalverteilung berechnet, da es sich hier um kleine Gruppen handelt, und bei normalverteilten Gruppen wurde der zweiseitige Student-t-Test angewandt oder bei signifikanter Varianz der Welch-Test. Bei ungleich verteilten Gruppen wurde der Mann-Whitney U Test genutzt. Alle Daten wurden bei GraphPad Prism Version 7.0 ausgewertet. Jede Maus wurde als Punkt mit der Standardabweichung angegeben. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden bei $p<0,05$ mit einem Stern, $p<0,01$ mit zwei Sternen und $p<0,001$ mit drei Sternen (*) angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Toxizität der ABCB5+ Zellen im Mdr2KO Mausmodell

3.1.1 Aussehen und Verhalten der Mäuse

Die Versuchstiere wurden während des gesamten Experiments engmaschig überwacht mittels Score Sheet, angepasst an die Empfehlungen der GV-Solas. Nach Implantation der osmotischen Pumpe und nach Zellinjektion wurden die Mäuse am ersten Tag im 2-Stunden- Rhythmus beobachtet, am nächsten Tag dreimal und ab dem dritten Tag zweimal. Dabei wurde auf Veränderungen des Fells und der Augen geachtet und auf das Verhalten der Mäuse, um eine mögliche Apathie zu erkennen. Zusätzlich wurde das Gewicht regelmäßig gemessen.

Nach Implantation der osmotischen Pumpen unter Narkose verhielten sich die Tiere zunächst noch ruhig und schläfrig, waren aber kurze Zeit später wieder agil und fraßen und tranken normal. Die Fellhygiene wurde spätestens ab dem zweiten Tag nach der Implantation der Pumpen wieder aufgenommen.

Ohne immunsupprimierende Pumpen verhielten sich die Tiere nach der Schwanzveneninjektion unter Narkose sofort wieder normal. Die Fellpflege wurde zu keiner Zeit vernachlässigt und die Augen zeigten keine Veränderungen.

3.1.2 Körper- und Lebergewicht der Mdr2KO Tiere

Die Gewichtsveränderung der Tiere wird in Abbildung 3.1.1A gezeigt, dabei werden die immunsupprimierten Mdr2KO Mäuse (*isMdr2KO*) in einer Gruppe zusammengefasst und in männliche und weibliche Tiere (3.1.1B) unterteilt, die zwei verschiedenen Injektionen miteinander verglichen (3.1.1C) und die Gruppe, der nicht immunsupprimierten Mäuse separat den Kontrollen gegenübergestellt (3.1.1D), um den Allgemeinzustand der Tiere abzubilden und eine mögliche Leberregeneration festzustellen. In allen Gruppen zeigt sich ein leichter Abfall des Körpergewichts nach der Implantierung der immunsupprimierenden osmotischen Pumpe, im Verlauf ist sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der behandelten Gruppe ein Gewichtsanstieg zu erkennen. Die Weibchen waren insgesamt leichter als die Männchen, sie unterschieden sich allerdings nicht zwischen der Gabe von ABCB5+ Zellen oder NaCl Injektion. Auch war kein Unterschied zwischen einer erfolgten

Injektion zu zwei Zellgaben erkennbar. Das Endgewicht war bei fast allen Mäusen höher als zu Beginn der Versuche, was man auf die Unterbringung in den Käfigen zurückführen kann. Die Tiere wurden zunächst in Gruppen gehalten und nach Implantation oder direkter Zellgabe in Einzelkäfige gesetzt.

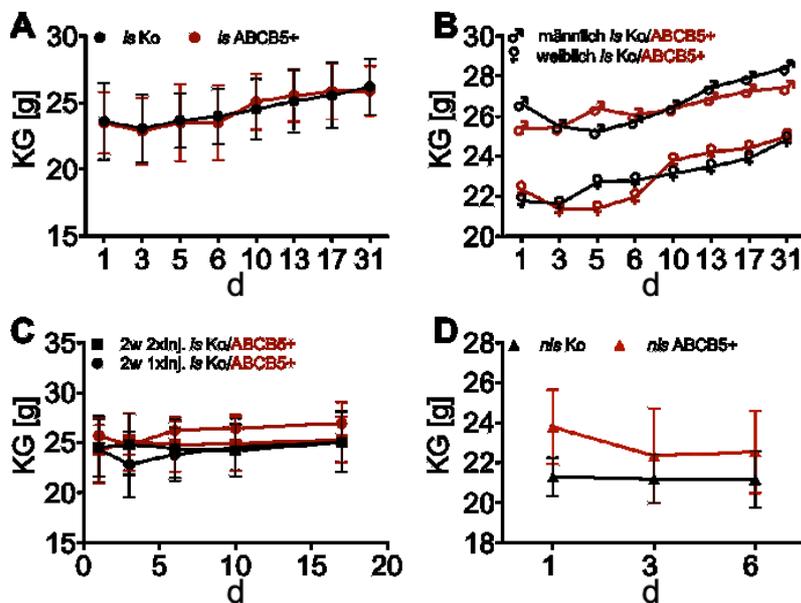


Abbildung 3.1.1 A-D: Körpergewicht der Mdr2KO Mäuse im Behandlungsverlauf. *is*Mdr2KO Mäuse (A) nach zwei Tagen, zwei und vier Wochen, (B) unterteilt nach Geschlecht, (C) zwei Wochen nach Behandlung mit einer und zwei Injektionen. (D) *nls*Mdr2KO Mäuse.

Am Ende des Versuchs wurden das Leber- und das kurz zuvor gemessene Körpergewicht der Mäuse ins Verhältnis gesetzt, um eine mögliche Vergrößerung oder Verkleinerung der Leber zu erkennen (Abbildung 3.12A). In allen *is*Mdr2KO Mäusen war kein Unterschied des Verhältnisses zwischen den unbehandelten und ABCB5+ behandelten Gruppen zu verzeichnen. Das Verhältnis zwischen Leber- und Körpergewicht war auch zwischen einmalig und zweimalig injizierten Mdr2KO Mäusen nicht verändert (Abbildung 3.1.2B).

Die nicht-immunsupprimierten Tiere (*nls*Mdr2KO) zeigten eine Tendenz der Abnahme des Leber/Körpergewicht-Verhältnisses, somit ist eine leichte Abnahme des Lebergewichts in den ABCB5+ behandelten Mdr2KO Mäusen zu vermerken, da sich das Körpergewicht der Mäuse nicht verändert bzw. leicht reduziert hat in der ABCB5+ Gruppe (Abbildung 3.1.2C).

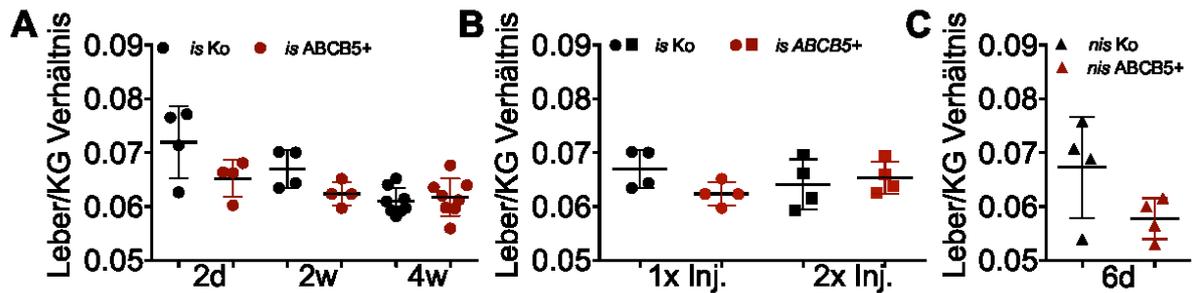


Abbildung 3.1.2 A-C: Verhältnis von Lebergewicht zum Körpergewicht der Mdr2KO Mäuse. *isMdr2KO* Mäuse (A) zwei Tage, zwei Wochen und vier Wochen nach Behandlung, (B) zwei Wochen nach Behandlung mit einer und zwei Injektionen. (C) *nisMdr2KO* Mäuse.

3.2 Geringer Einfluss der ABCB5-Zellbehandlung auf leberspezifische Enzyme und Parameter im Plasma

Um eine Leberschädigung festzustellen, wurden im Plasma der Tiere die Aminotransferasen ALT und AST und weitere leberspezifische Parameter gemessen. Bei den *isMdr2KO* Mäusen ist kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den mit ABCB5+ Zellen behandelten Tieren zu erkennen (Abbildung 3.2.1). Bei allen Zeitpunkten sind weder die Werte der leberspezifischen ALT, der AST noch der AP nicht verändert. Die AP als Cholestaseparameter gibt den Stau der Gallensäure in den Gallengängen an und kann auch auf einen intrahepatischen Schaden hinweisen. Die LDH gilt als Marker für Zellschädigung und ist bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht erhöht. Anhand der leberspezifischen Enzyme konnten wir keinen Leber- und Zellschaden in den *isMdr2KO* Mäusen durch die ABCB5+ Zellen feststellen.

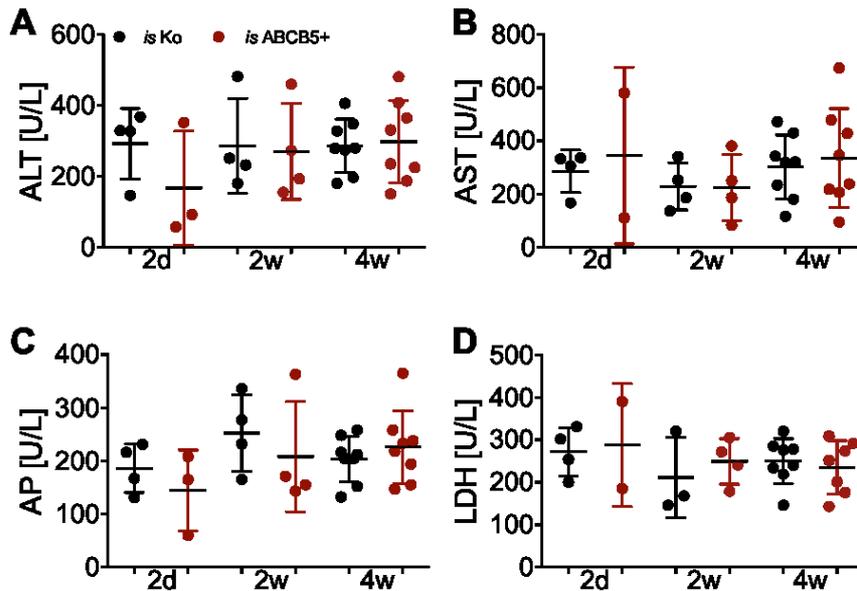


Abbildung 3.2.1 A-D: Typische Leberwerte der *isMdr2KO* Mäuse zwei Tage, zwei und vier Wochen nach Behandlung. (A) Alanin-Aminotransferase, (B) Aspartat-Aminotransferase, (C) Alkalische Phosphatase, (D) Laktatdehydrogenase

Auch bei einer doppelten Dosis der Zellen in zwei wöchentlich gefolgten Injektionen zeigte sich in keinem der untersuchten Parameter ein Unterschied zu den nach zwei Wochen untersuchten Tieren mit nur einer Injektion (Abbildung 3.2.2).

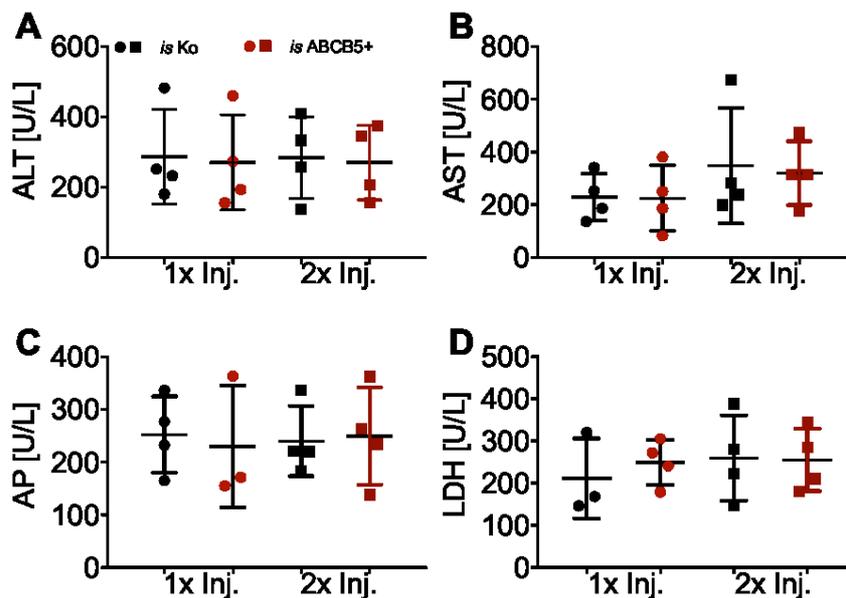


Abbildung 3.2.2 A-D: Typische Leberparameter der *isMdr2KO* Mäuse mit zwei Injektionen. (A) Alanin-Aminotransferase, (B) Aspartat-Aminotransferase, (C) Alkalische Phosphatase, (D) Laktatdehydrogenase. Verglichen mit einer Injektion, gemessen nach 2 Wochen nach Zellgabe.

Bei den *nlsMdr2KO* Mäusen scheinen die ABCB5⁺ Zellen einen größeren Einfluss auf die Plasmawerte zu haben. Ohne Immunsuppression zeigen die ABCB5⁺ Zellen sowohl auf die leberspezifische Aminotransferase ALT als auch auf LDH als Parameter der Zellschädigung in den behandelten Tieren nach sechs Tagen eine leichte Reduktion (Abbildung 3.2.3A, D). Die weiteren Parameter wie AST und AP haben sich zwischen den Kontrolltieren und den ABCB5⁺ behandelten Tieren nicht verändert.

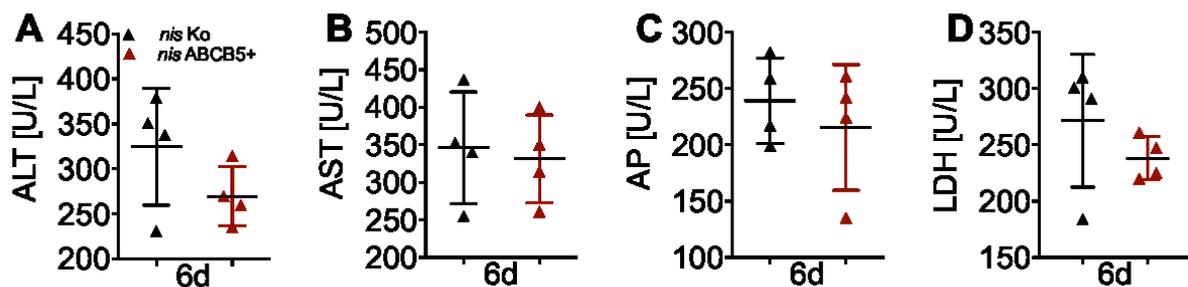


Abbildung 3.2.3 A-D: Typische Leberparameter der *nlsMdr2KO* Mäuse. (A) Alanin-Aminotransferase, **(B)** Aspartat-Aminotransferase, **(C)** Alkalische Phosphatase, **(D)** Laktatdehydrogenase

3.3 Verbesserung der Leberfibrose im *Mdr2KO* Mausmodell durch ABCB5⁺ Zellen

Die Untersuchung des fibrotischen Umbaus der Leber in *Mdr2KO* Mäusen ist von großer Bedeutung. Hierbei wird das Gewebe in kollagenreiche extrazelluläre Matrix umgebaut. Der Prozess vermindert die Funktion der Leber und engt durch Narbengeflechte Blut- und Gallenwege ein, womit sich der Prozess des Leberschadens weiter fortsetzt. Die Fibrose wurde auf verschiedenen Ebenen durch typische Fibrosemarker untersucht. Sowohl mit der Picro-Sirius-Rot-Färbung, direkt im Gewebe mittels der Aminosäure Hydroxyprolin als surrogater Marker für Kollagen als auch auf mRNA-Ebene mit spezifischen Markern wurde die Fibrose bzw. der Kollagengehalt gemessen.

3.3.1 Reduktion des Kollagengehalts in fibrosespezifische Färbungen ABCB5⁺ behandelter *Mdr2KO* Mäuse

Um den fibrotischen Umbau der Leber zu zeigen, hat sich die Picro-Sirius-Rot-Färbung etabliert. Dabei werden Kollagenfasern, hauptsächlich Kollagen I rot angefärbt. Zytoplasma und die Muskelfasern werden gelb durch diese Färbung

dargestellt. Hierbei ist der Kontrast zwischen extrazellulärer Matrix und normalem Lebergewebe deutlich zu sehen und zu quantifizieren.

Nach der Behandlung der *isMdr2KO* Mäuse ist sowohl nach zwei Wochen als auch nach vier Wochen nach ABCB5+ Zellen-Injektion eine signifikante Reduktion (2w: $p=0,029$; 4w: $p=0,017$) des Kollagens an den Portalvenen der behandelten Gruppen zu sehen (Abbildung 3.3.1). Vor allem im Bereich der Portalvenen ist die Abnahme des Kollagens am stärksten zu beobachten, was zu erwarten war, da die Fibrose von *Mdr2KO* Mäusen an den Portalfeldern am größten ist, denn dort ist der Leberschaden durch die Gallensäuren entstanden. In den Bereichen der Zentralvenen und dem midzonalen Raum ist eine Tendenz der Kollagenreduktion in den behandelten Tieren erkennbar. Der chronische Verlauf der *Mdr2KO* Mäuse ist auch in Abbildung 3.3.1C erkennbar, da sowohl die Kontrollen der *isMdr2KO* Mäuse als auch der behandelten Tiere maßgeblich mehr Kollagen nach vier Wochen als nach zwei Wochen aufweisen (Kontrollen: $p=0,049$). Zudem kann man eine signifikante Reduktion des gesamten gefärbten Picro-Sirius-Rot-Areals an beiden Zeitpunkten erkennen (2w: $p=0,029$; 4w: $p=0,037$).

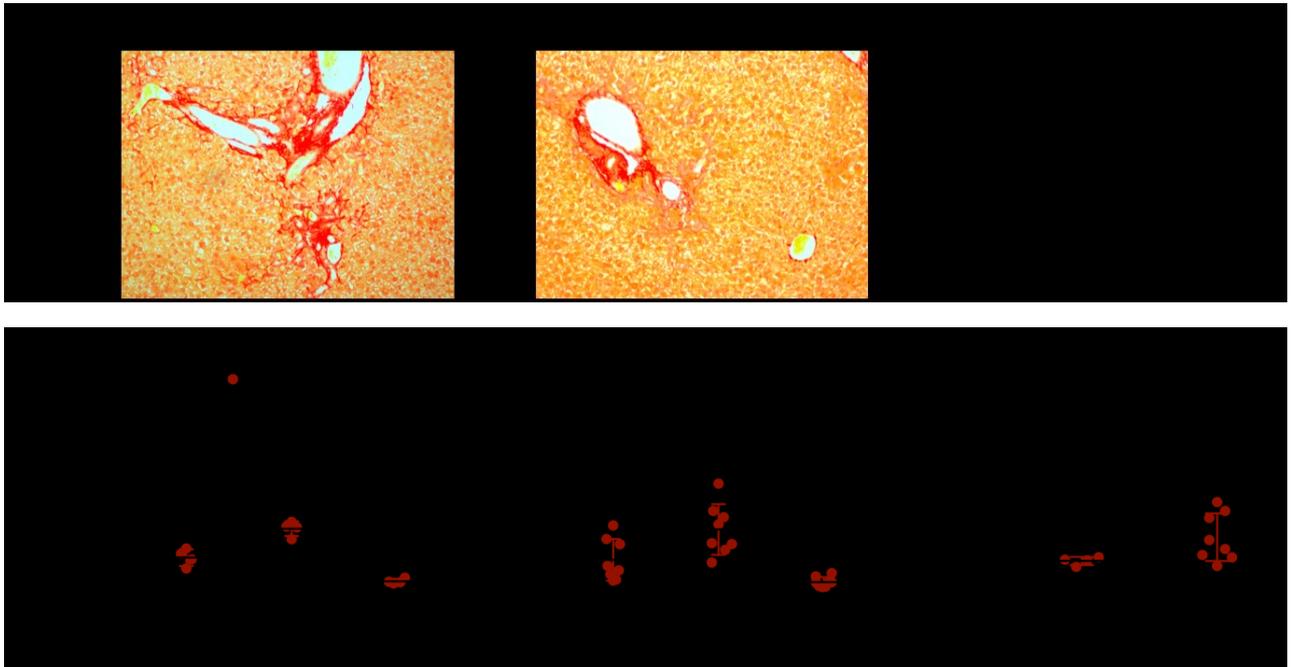


Abbildung 3.3.1 A-C: Picro-Sirius-Rot Färbung der *isMdr2KO* Mäuse. (A) nach zwei, **(B)** vier Wochen und **(C)** Zusammenfassung der gefärbten Bereiche in 10facher Vergrößerung.

Mit zwei Injektionen von ABCB5+ Zellen in *isMdr2KO* Mäuse nimmt das Kollagen wie bei den einfach injizierten *isMdr2KO* Mäusen am Portalfeld signifikant ($p=0,04$) ab

und der Trend der Reduktion an den Zentralvenen ($p=0,057$) der Tiere zwei Wochen nach einmaliger Behandlung verstärkt sich und wird hier signifikant ($p=0,039$) (Abbildung 3.3.1D). Auch den ganzen Leberschnitt betrachtend ist eine signifikante Reduktion zu erkennen ($p=0,018$) (Abbildung 3.3.1E).

Eine ähnliche Beobachtung kann man auch bei den *nisMdr2KO* Mäusen machen: in den supprimierten behandelten Tieren ist der Rückgang des Kollagens an den Portalvenen maßgeblich ($p=0,011$), wie insgesamt eine stark signifikante Reduktion zu vermerken ist ($p=0,003$) (Abbildung 3.3.1G), wobei hier auch eine unverkennbare Abnahme im midzonalen Feld ($p=0,003$) zu sehen ist (Abbildung 3.3.1F). Die Reduktion des Kollagens in den mit ABCB5+ behandelten *Mdr2KO* Mäusen an den Zentralvenen ist hier durch einen Trend erkennbar.

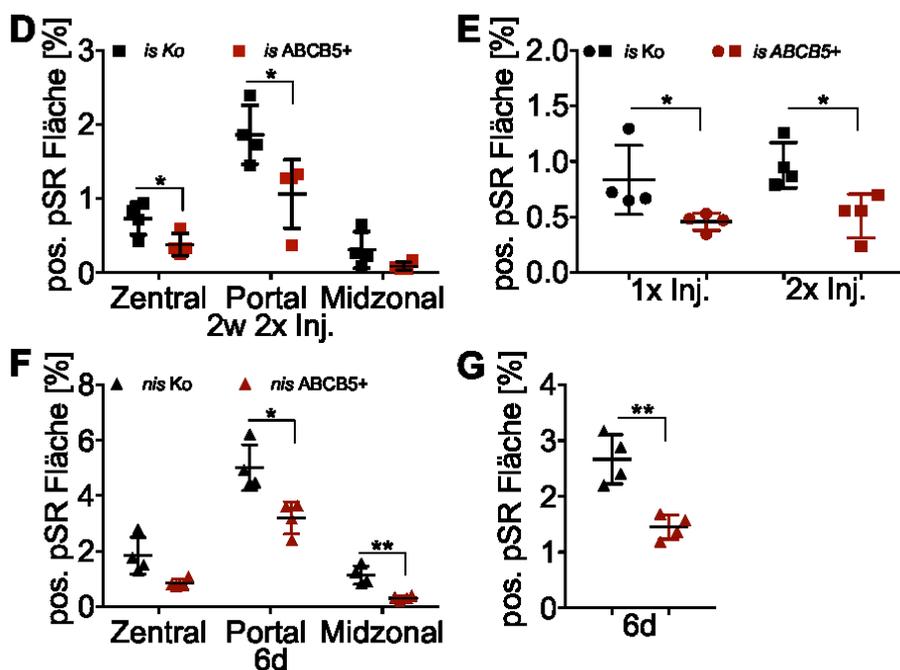


Abbildung 3.3.2 D-G: Picro-Sirius-Rot-Färbung der (D-E) *isMdr2KO* Mäuse mit zwei Zellinjektionen; verglichen mit einer Injektion, gemessen 2 Wochen nach Zellgabe und (F-G) *nisMdr2KO* Mäuse.

3.3.2 Unveränderter Hydroxyprolingehalt der Leber bei Gabe von ABCB5+ Zellen

Da die Aminosäure Hydroxyprolin fast ausschließlich in Kollagen vorkommt, kann man mit der Bestimmung der Konzentration von Hydroxyprolin auf den totalen Gehalt von Kollagen im Lebergewebe schließen.

Der Hydroxyprolingehalt der immunsupprimierten *Mdr2KO* Mäuse zeigt im Gegensatz zu den Picro-Sirius-Rot-Färbungen keine Reduktion des Kollagens, im

Gegenteil, man kann eine Tendenz der Zunahme in den ABCB5+ behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen (Abbildung 3.3.2A).

Der Hydroxyprolinegehalt der Kontrolltiere mit zweifacher Injektion ist zwar höher als bei den unbehandelten Tieren mit nur einer Injektion zum gleichen Zeitpunkt, aber im Vergleich zwischen den mit ABCB5+ Zellen behandelten *isMdr2KO* Mäusen ist in der doppelt injizierten Gruppe eine leichte Reduktion des Hydroxyprolinegehalts wieder im Vergleich zu den einfach injizierten ABCB5+ Tieren zu sehen (Abbildung 3.3.2 B).

Die immunkompetenten *Mdr2KO* Mäuse mit der ABCB5+ Behandlung weisen genau wie die zweifach behandelten *isMdr2KO* Mäuse eine leichte Reduktion von Hydroxyprolin im Gegensatz zur Kontrollgruppe auf (Abbildung 3.3.2C).

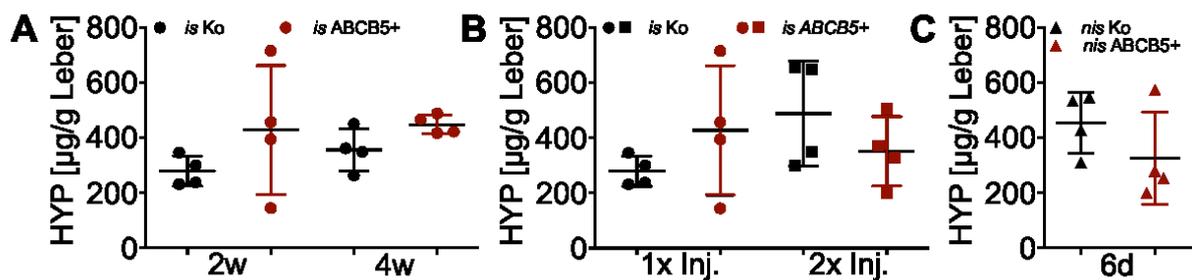


Abbildung 3.3.3: Hydroxyprolinegehalt in den Lebern der *Mdr2KO* Tiere. (A) *isMdr2KO* Mäuse nach zwei und vier Wochen, (B) *isMdr2KO* mit einer oder 2 Injektionen und (C) *nisMdr2KO* Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren behandelt mit NaCl.

3.3.3 Einfluss der ABCB5+ Zellbehandlung von *Mdr2KO* Mäusen auf Gene der Fibrogenese

Um die Wirkung der ABCB5+ Zellen auf Gen-Ebene zu sehen, wurden mit Hilfe der semi-quantitativen RT-PCR entsprechende Fibrogenese-Gene gemessen. Hierbei wurde eine Auswahl konventioneller Marker für die Fibrose typische Gene verwendet. Der Gewebehinhibitor der Metalloproteinase-1 (Timp1) wird mit der Umstrukturierung der ECM in Verbindung gebracht. Der Connectiv tissue growth factor (Ctgf) kann an verschiedene Proteine der ECM binden, eine Überexpression von Fibroblasten kann zur Fibrose führen und hat einen Einfluss auf die Zellprozesse wie z. B. die Angiogenese. Weitere wichtige Marker sind das Kollagen Typ I, alpha1 (Col1A1) und der Tissue growth factor beta 1 (Tgfb1), der die Entstehung von chronischem Leberschaden weitgehend reguliert (Dooley and Ten Dijke, 2012). All diese Faktoren spielen eine entscheidende Rolle in der Fibroseentstehung.

ABCB5+ Zellen scheinen keinen Einfluss auf die Fibrogenese-Gene der *isMdr2KO* Mäuse zu haben. Weder direkt zwei Tage nach der Zellinjektion noch im Verlauf von zwei oder vier Wochen ist die Expression der Gene verändert. Lediglich bei der Expression von Col1A1 ist ein Trend der Hochregulation in den behandelten Tieren zu beobachten, der nach vier Wochen nach Gabe der ABCB5+ Zellen am stärksten ausfällt (Abbildung 3.3.4).

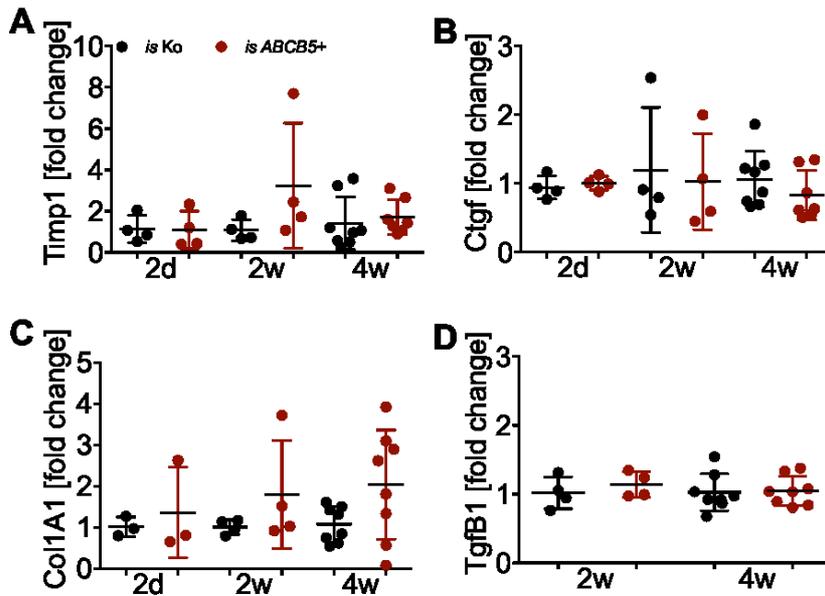


Abbildung 3.3.4 A-D: Genexpressionsmessung fibrotischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in *isMdr2KO* Mäusen. (A) Timp1, (B) Ctgf, (C) Col1A1 und (D) Tgfb1 nach zwei Tagen, zwei und vier Wochen nach Behandlung.

Auch nach zwei Injektionen ist keine Veränderung der Fibrogenese-Gene zu erkennen. Col1A1 ist im Gegensatz zu einer einfachen ABCB5+ Zellgabe nicht verändert. (Abbildung 3.3.5).

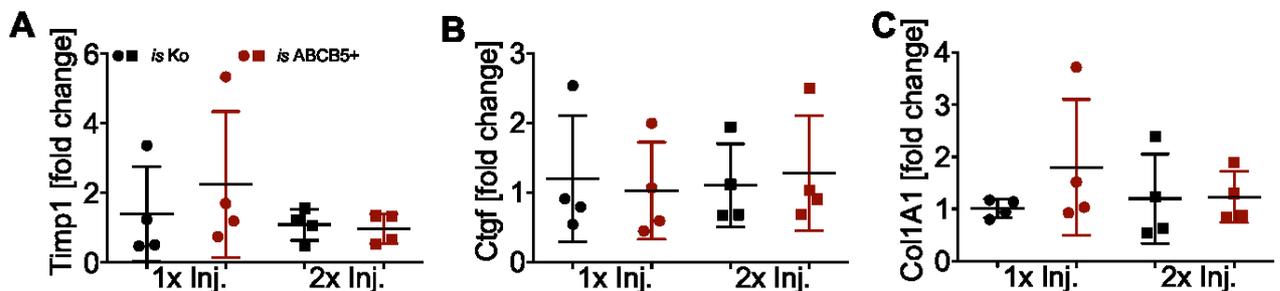


Abbildung 3.3.5 Genexpressionsmessung fibrotischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in *isMdr2KO* Mäusen mit einer und zwei Injektionen. (A) Timp1, (B) Ctgf, (C) Col1A1 nach zwei Wochen der ersten Behandlung.

Bei der Expression fibrotischer Gene bei den *nisMdr2KO* Mäusen, gemessen nach sechs Tagen nach Injektion, verhält es sich anders. Im Gegensatz zu den *isMdr2KO* Mäusen, bei denen keine Expression erkennbar war, lediglich ein leichter Trend des *Col1A1*. *Timp1* und *CTGF* sind ähnlich wie die Kontrollen exprimiert. Zu sehen ist der Trend einer Abnahme des *Col1A1*, und eine Erhöhung der *Tgfb1* Expression (Abbildung 3.3.6).

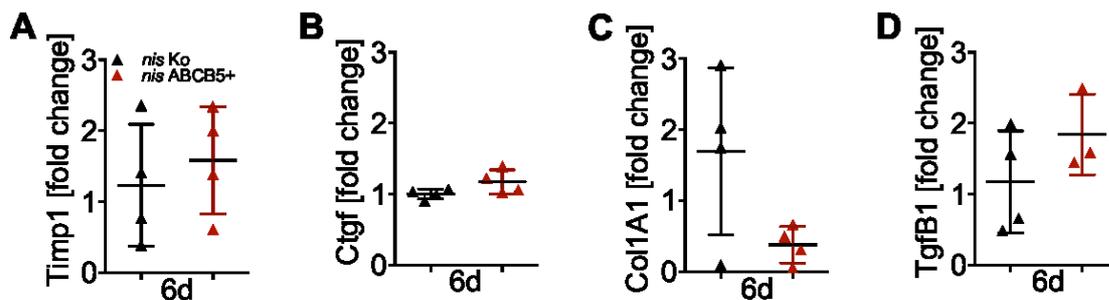


Abbildung 3.3.6: Genexpressionsmessung fibrotischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in *nisMdr2KO*. (A) *Timp1*, (B) *Ctgf*, (C) *Col1A1* und (D) *Tgfb1* nach sechs Tagen nach Behandlung.

3.4 Keine Aktivierung der hepatischen Sternzellen in *isMdr2KO* Mäusen

Bei chronischen Lebererkrankungen findet häufig eine Aktivierung der hepatischen Sternzellen (HSC) statt, die durch das glattmuskuläre Aktin (α SMA) wiedergegeben wird. Das glattmuskuläre Protein SM22 α spiegelt portale Fibroblasten wieder, die vor allem bei einer biliären Fibrose vorkommen (Dranoff and Wells, 2010).

Die aktiven Sternzellen sind sowohl auf mRNA Ebene als auch in der Färbung der *isMdr2KO* Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren in den mit ABCB5+ Zellen behandelten *Mdr2KO* Mäusen nicht verändert (Abbildung 3.4.1A).

Die Quantifizierung der *isMdr2KO* Mäuse mit doppelter Dosis der Behandlung in zwei aufeinanderfolgenden Injektionen mit ABCB5+ Zellen verändert die Aktivierung der Sternzellen weder in der Genexpression noch auf Proteinebene in den Färbungen. (Abbildung 3.4.1A,B).

Gegenteilig verhalten sich die *nisMdr2KO* Mäuse. Auf mRNA Ebene ist eine signifikante Erhöhung der ASma Expression zu sehen ($p=0,044$), in Kontrast zu der Färbung. Dort fällt eine maßgebliche Reduktion im Bereich des Portalfelds auf ($p=0,021$) (Abbildung 3.4.1C), die sich als Trend auch auf den gesamten Leberschnitt auswirkt.

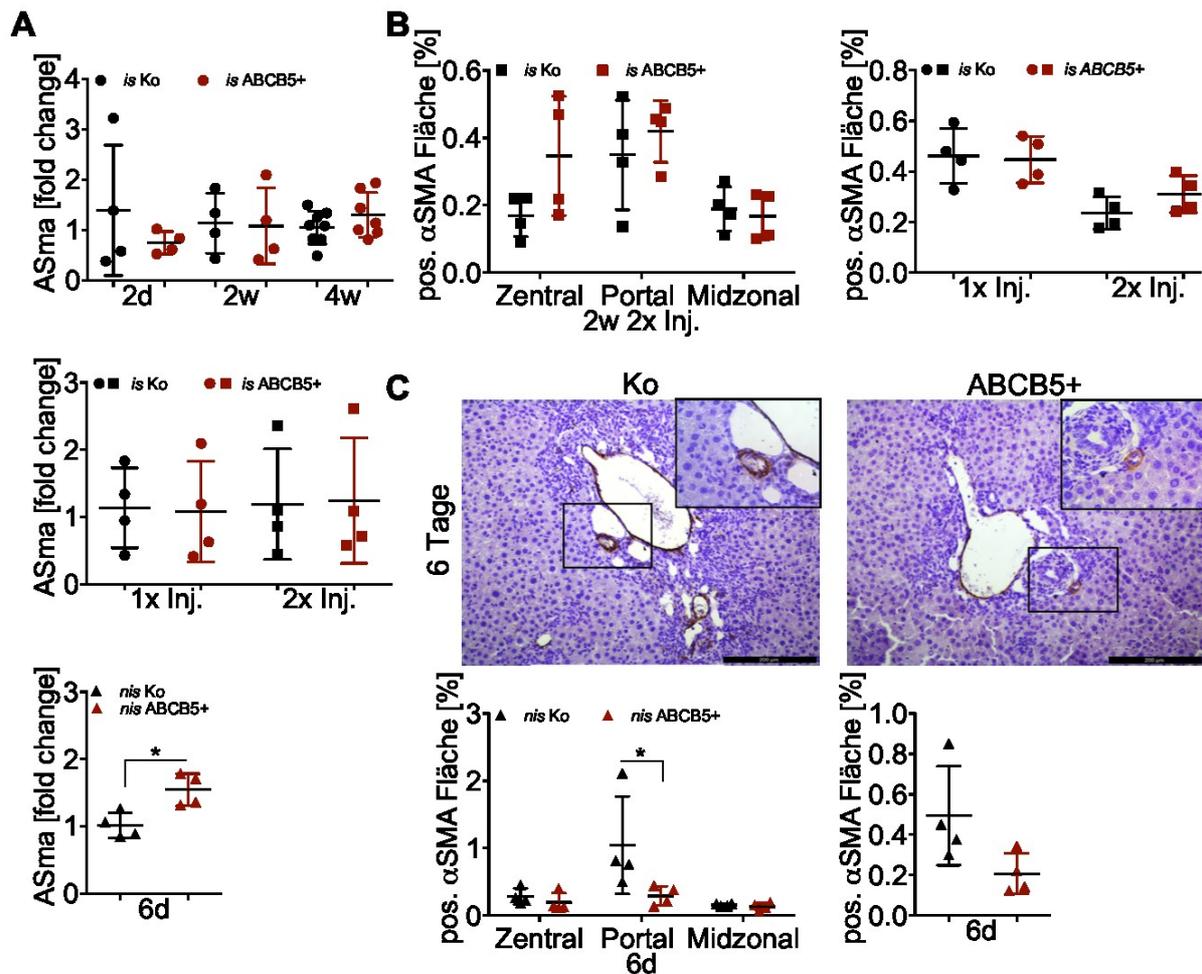


Abbildung 3.4.1: Aktivierung der Sternzellen. (A) Genexpression von ASma in *isMdr2KO* Mäusen mit einer und zwei Injektionen und in *nisMdr2KO* Mäusen. **(B)** αSMA Färbung von behandelten Tieren mit zwei Injektionen. **(C)** αSMA Färbung von *nisMdr2KO* Mäusen sechs Tage nach Zellinjektion.

Die immunhistochemische Färbung der portalen Fibroblasten mit SM22α zeigt keine Veränderung nach Behandlung mit ABCB5+ Zellen der *isMdr2KO* Mäuse (Abbildung 3.4.2). In keinem Bereich ist ein Unterschied zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren zu beobachten. Lediglich ist eine leichte Tendenz eines Anstiegs der positiv gefärbten SM22α Fläche ist im Portalvenen-Bereich zwei Wochen nach Zellinjektion zu vermerken. Dieser zeigt sich auch, hier sogar signifikant, im Portalfeld der doppelt injizierten ABCB5+ Zellen ($p=0,036$). Der Effekt spielt allerdings für die gesamte Färbung nur eine kleine Rolle (Abbildung 3.4.2B). Die Gruppe der nicht-immunsupprimierten *Mdr2KO* Mäuse mit ABCB5 Zellinjektion scheint genau wie die immunsupprimierte Gruppe nicht beeinflusst. Die positive SM22α Fläche ist auch hier nicht verändert.

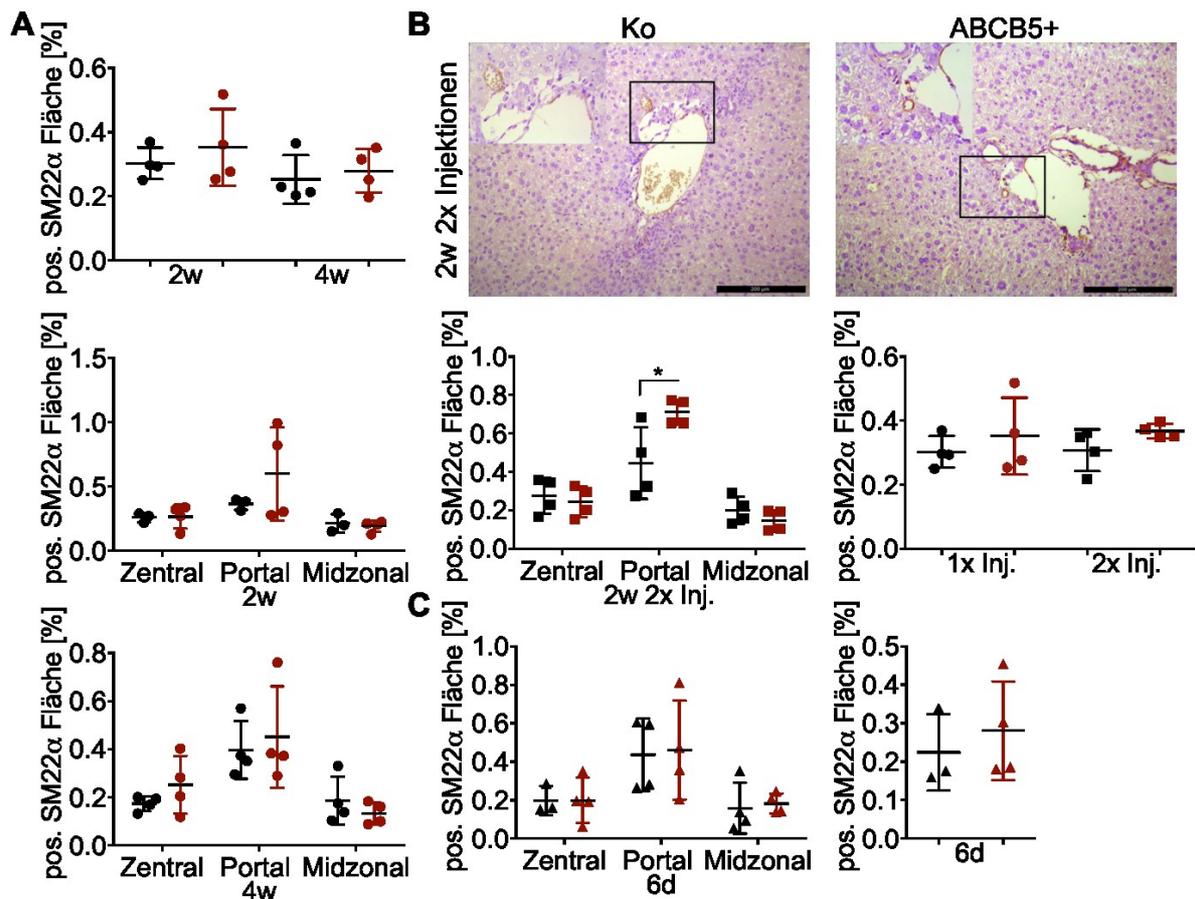


Abbildung 3.4.2: Fibroblasten Färbung mit SM22 α ; (A) positive Fläche des gesamten Schnitts und die Aufteilung zwischen den Bereichen der Zentralvenen (Zentral), der Portalvenen (Portal) und dem midzonalen Bereich (Midzonal) in 10facher Vergrößerung. Mit den Zeitpunkten von zwei und vier Wochen in *isMdr2KO* Mäusen, (B) mit zwei Injektionen und (C) bei *nisMdr2KO* sechs Tage nach Zellinjektion.

3.5 Inflammatorische Antwort auf ABCB5+ Zellen

Die Inflammation hat eine große Bedeutung auf den chronischen Verlauf eines Leberschadens, der auch stark in den *Mdr2KO* Mäusen zu finden ist. Der Aufstau der Gallenflüssigkeit, die Cholestase, führt zu Inflammation und Toxizität des Lebergewebes.

Die inflammatorischen Zellen können im Allgemeinen in proinflammatorische M1 Makrophagen und in antiinflammatorische, auch M2 genannte Makrophagen, unterteilt werden.

3.5.1 Reduktion inflammatorischer Infiltrate in Mdr2KO Mäusen ohne Immunsuppression mit ABCB5+ Zellen

Um Aspekte von Inflammation zu betrachten, wurden die Leberschnitte mit drei unterschiedlichen Markern angefärbt. Dabei wurde F4/80 als allgemeiner Makrophagen Marker, CD163 als Vertreter der M2 Makrophagen und CD45 als Leukozytenmarker verwendet.

Am deutlichsten ist ein Anstieg der Makrophagen bei den *isMdr2KO* Mäusen zu sehen (Abbildung 3.5.1A). Infiltrate F4/80 positiver Zellen sind nach zwei Wochen signifikant erhöht ($p=0,007$), welches mittels der Fläche gefärbter F4/80 positiver Zellen quantifiziert wurde. In allen quantifizierten Bereichen ist dies zu beobachten (Zentral: $p=0,023$; Portal: $p=0,008$; Midzonal: $p=0,01$). Nach vier Wochen ist ein starker Trend eines Anstiegs zu sehen, der im portalen Feld maßgeblich erhöht ist ($p=0,023$). Der M2 Makrophagen Marker CD163 ist nach vier Wochen nach Zellgabe signifikant erhöht ($p=0,036$), besonders im Bereich der Zentralvenen ($p=0,002$), dies ist allerdings nach zwei Wochen nach Behandlung mit ABCB5+ Zellen noch nicht sichtbar. Auch hierbei wurde die positive Fläche des Schnittes ausgewertet. Die einzelnen ausgezählten CD45 positiven Zellen sind zwischen den behandelten Mdr2KO Mäusen und Kontrolltieren nicht verändert.

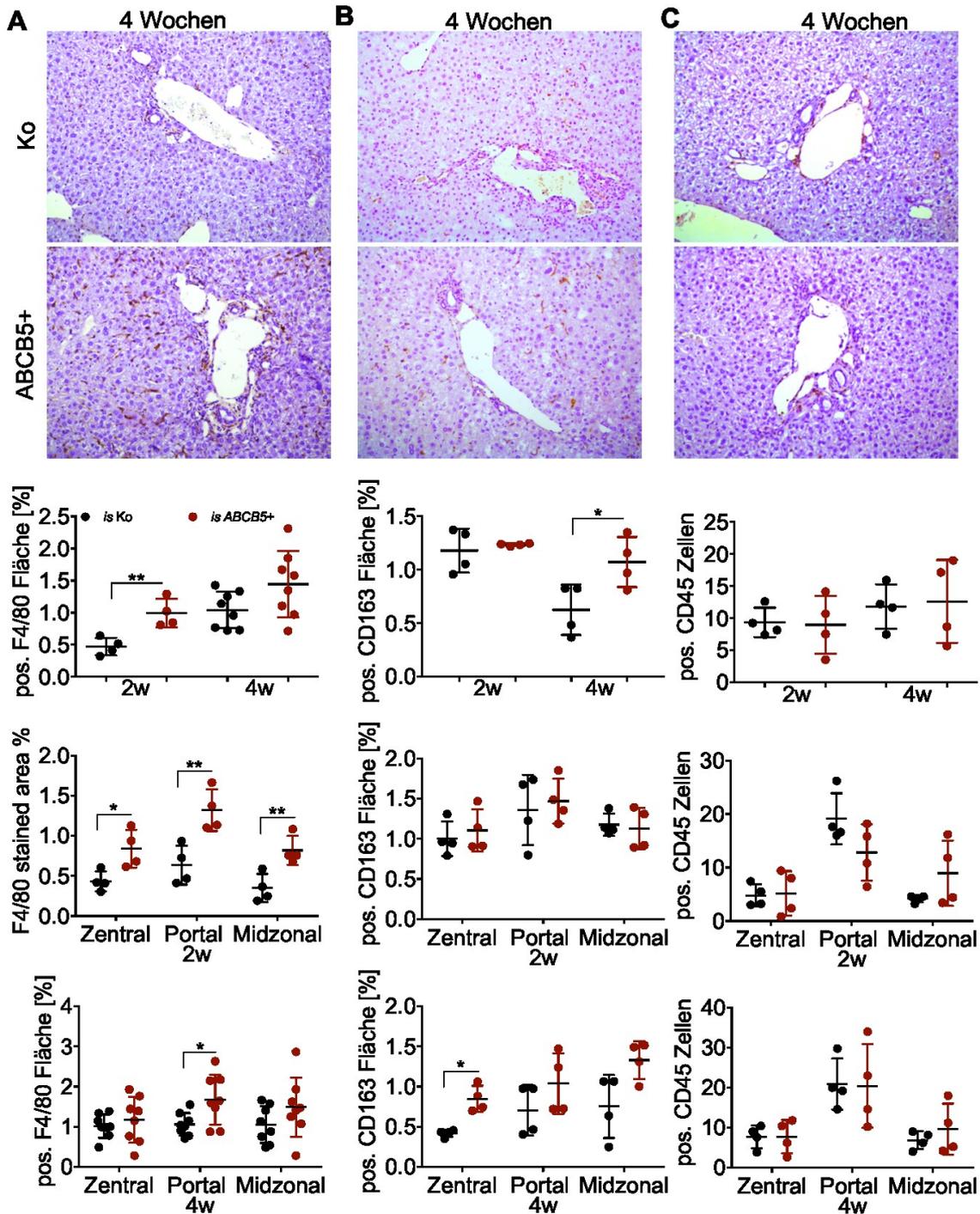


Abbildung 3.5.1: Inflammationsmarker in Mdr2KO Mäusen. (A) F4/80, (B) CD163 und (C) CD45 der gesamten Fläche und unterschieden zwischen den Bereichen der Zentralvenen (Zentral), der Portalvenen (Portal) und dem midzonalen Bereich (Midzonal). Aufgeteilt in die Zeitpunkte zwei und vier Wochen in 10facher Vergrößerung.

Nach zwei Wochen nach zweifacher Gabe von ABCB5+ Zellen ist wie nach einmaliger Gabe der Zellen kein Unterschied der CD163- positiven Fläche und der CD45- positiven Zellen zwischen den Gruppen zu beobachten (Abbildung 3.5.2).

Eine doppelte Injektion scheint die Inflammation der Leber in *Mdr2KO* Mäusen nicht zu beeinflussen.

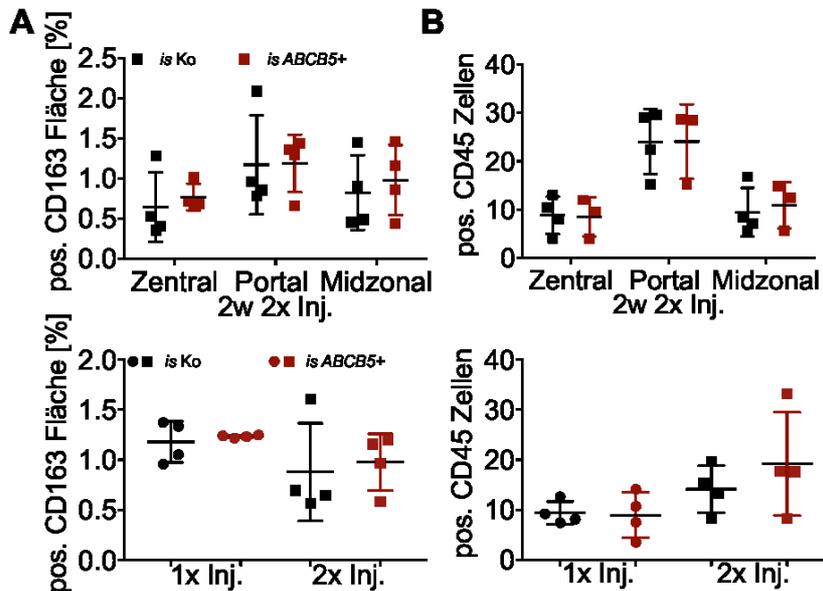


Abbildung 3.5.2: Inflammationsmarker CD163 und CD45 in *isMdr2KO* Mäusen mit zweifacher Injektion von ABCB5+ Zellen nach 2 Wochen. Verglichen mit einer Injektion, gemessen nach 2 Wochen nach Zellgabe.

Bei den *nisMdr2KO* Mäusen scheinen die ABCB5+ Zellen eine andere Wirkung auf M1 Makrophagen zu haben. An den Zentralvenen ist eine maßgebliche Reduktion der F4/80 positiven Fläche zu sehen ($p=0,021$), die sich als Tendenz auch auf gesamter Fläche widerspiegelt (Abbildung 3.5.3). Die CD163 positive Fläche und die CD45 positiven Zellen der ABCB5+ behandelten Tiere sind im Vergleich zu den Kontrolltieren nach sechs Tagen nicht verändert.

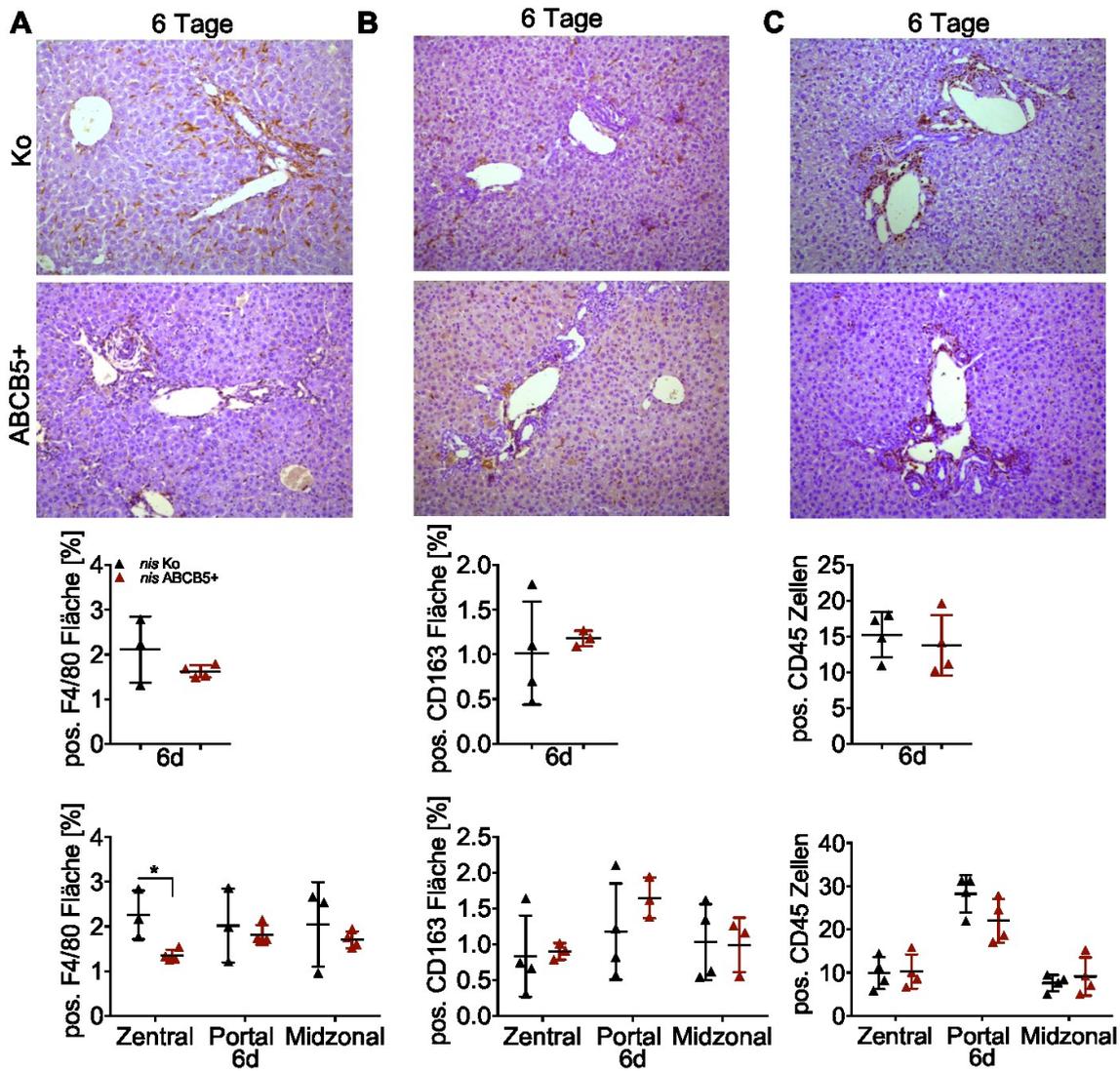


Abbildung 3.5.3: Inflammationsmarker in *nisMdr2KO* Mäusen. (A) F4/80, (B) CD163 und (C) CD45 der gesamten Fläche und unterschieden zwischen den Bereichen der Zentralvenen (Zentral), der Portalvenen (Portal) und dem midzonalen Bereich (Midzonal) zum Zeitpunkt von sechs Tagen in 10facher Vergrößerung.

3.5.2 Veränderung der inflammatorischen Genexpression nach ABCB5-Zellgabe in *isMdr2KO* Mäusen

In immunsupprimierten *Mdr2KO* Mäusen hat eine ABCB5+ Zellbehandlung keinen Einfluss auf inflammatorische Genexpression. Der Tumornekrose-Faktor alpha (*TnfA*), die Interleukine 1 beta (*Il1B*) und 6 (*Il6*) zählen zu den proinflammatorischen Markern, wohingegen *Il10* und der Interleukin-1 Rezeptorantagonist (*Il1ra*) den antiinflammatorischen Zytokinen zugeordnet werden.

Weder lassen sich Unterschiede der M1 noch der M2 Marker zwischen einer Behandlung von ABCB5+ Zellen und einer Injektion mit NaCl feststellen (Abbildung 3.5.4).

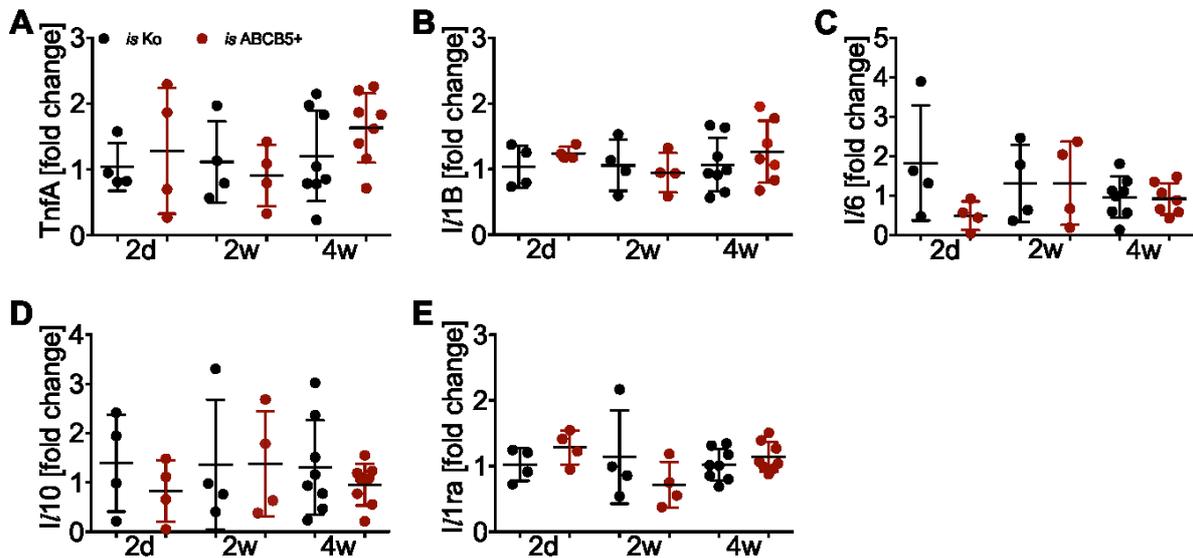


Abbildung 3.5.4 (A-E): Genexpressionsmessung inflammatorischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in *isMdr2KO*; (A) TnfA, (B) Il1B, (C) Il6, (D) Il10, (E) Ilra in *isMdr2KO* Mäusen nach zwei Tagen, zwei und vier Wochen.

Auch in der Gruppe mit doppelter Gabe von ABCB5+ Zellen zeigt sich kein weiterer Effekt auf die inflammatorischen Markergene (Abbildung 3.5.5).

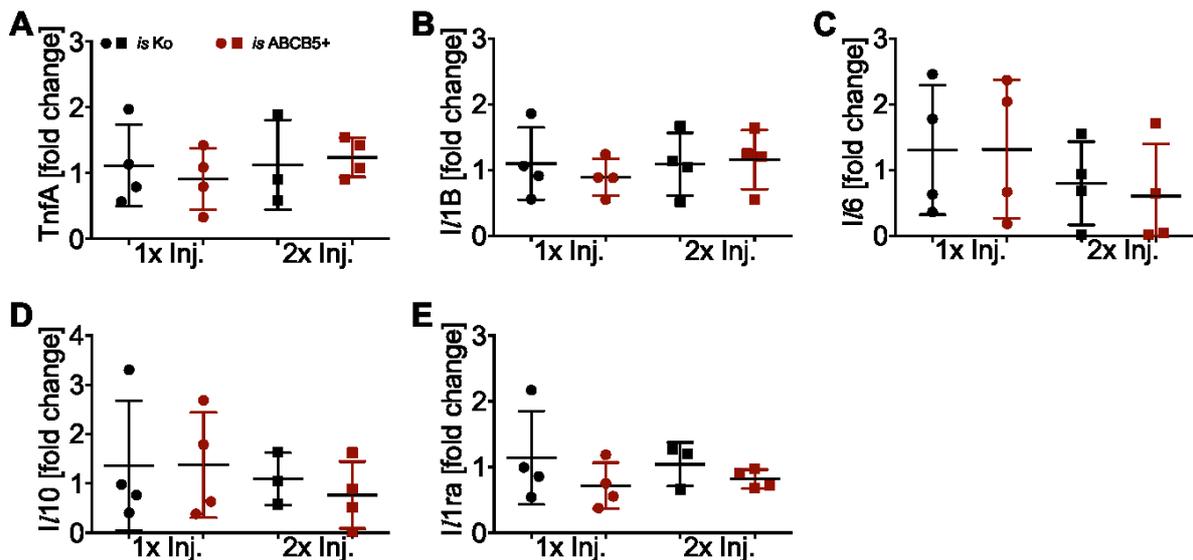


Abbildung 3.5.5: Genexpressionsmessung inflammatorischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in *isMdr2KO* mit einer und zwei Injektionen; (A) TnfA, (B) Il1B, (C) Il6, (D) Il10, (E) Ilra, zwei Wochen nach der ersten Behandlung.

In der Gruppe der nicht-immunsupprimierten *Mdr2KO* Mäuse scheinen die ABCB5+ Zellen einen Effekt auf die inflammatorischen Zytokine zu haben. Sowohl *Il1B* ($p=0,044$) als auch *Il10* ($p=0,034$) sind signifikant erhöht (Abbildung 3.5.6), beide Gene repräsentieren einen Anstieg beider Makrophagentypen.

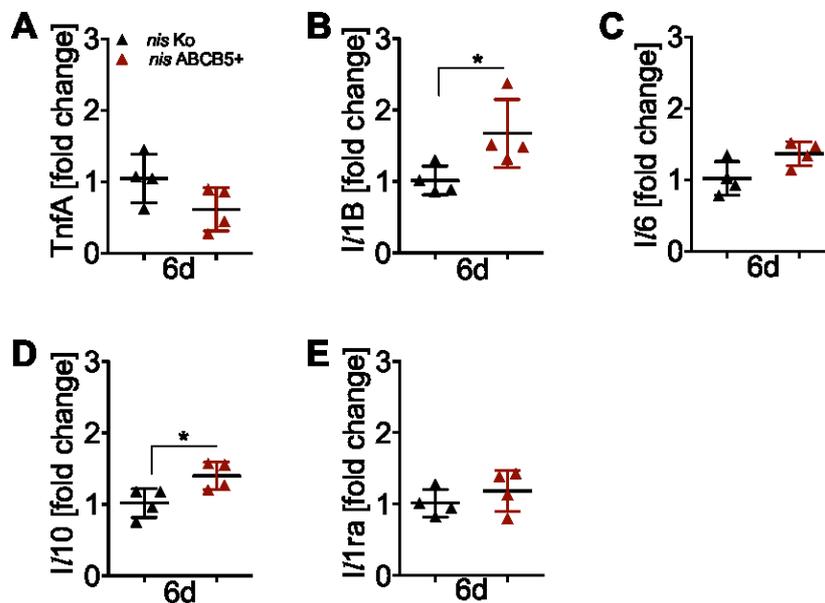


Abbildung 3.5.5: Genexpressionsmessung inflammatorischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in *nisMdr2KO*; (A) TnfA, (B) Il1B, (C) Il6, (D) Il10, (E) Ilra nach sechs Tagen.

3.6 Proliferation der Leberzellen auf ABCB5+ Zellen

Zur Bestimmung der Teilung der Zellen wird häufig der Proliferationsmarker Ki-67 eingesetzt. Dieser wird über einen Antikörper immunhistochemisch in den Leberschnitten nachgewiesen. Man kann zwischen proliferierenden Hepatozyten (HC) und nichtparenchymalen Zellen (NPC) unterscheiden. Zur zweiten Gruppe gehören die Endothelzellen, Kupffer-Sternzellen, hepatische Sternzellen, Pit- und Ovalzellen. Die Zellen wurden in HCs und NPCs unterteilt und ausgezählt. Die Proliferation der Hepatozyten ist in den *isMdr2KO* Mäusen nach zwei Wochen im Portalfeld ($p=0,02$) und Midzonal ($p=0,036$) signifikant erhöht (Abbildung 3.6.1). Insgesamt lässt sich ein deutlicher Trend einer erhöhten Proliferationsrate ($p=0,057$) nachweisen. Vier Wochen nach ABCB5+ Zellgabe ist nur eine Tendenz der gesteigerten Proliferationsrate der Hepatozyten und der nichtparenchymalen Zellen zu beobachten.

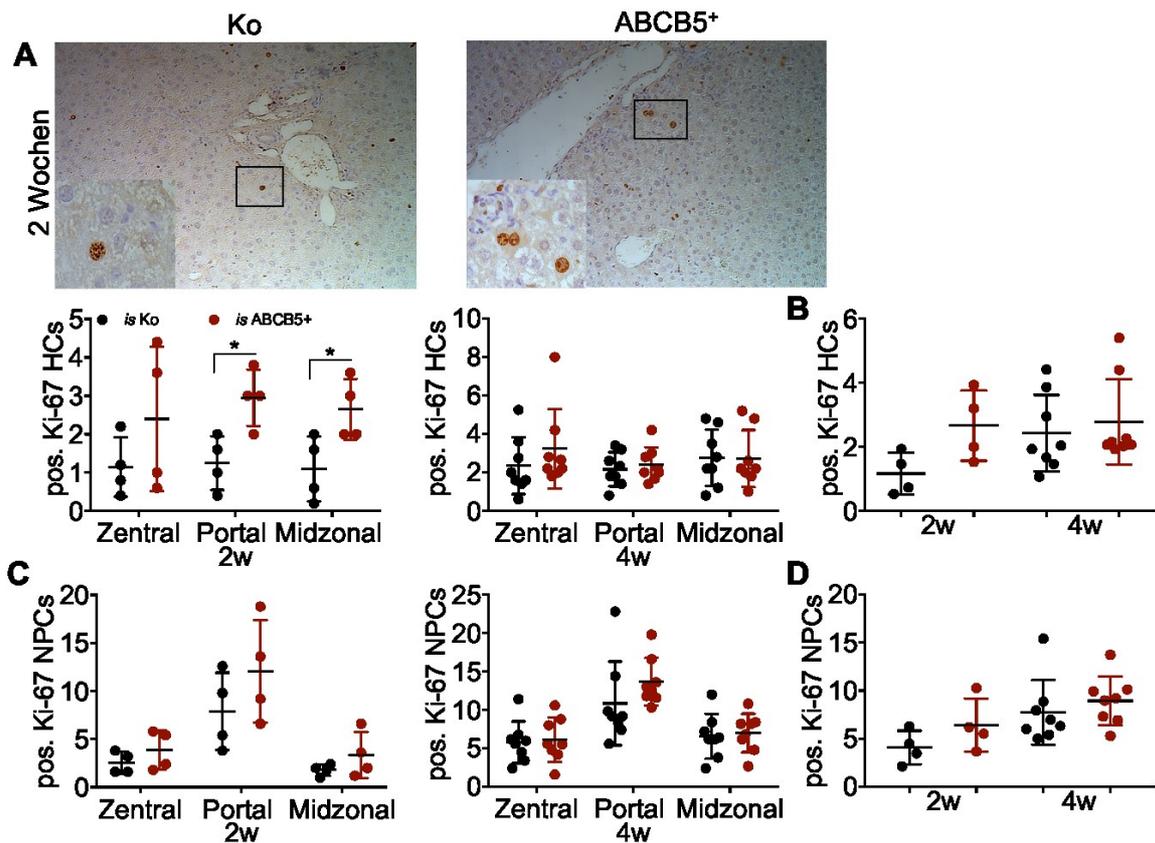


Abbildung 3.6.1 A-D: Proliferation der Leberzellen der *isMdr2KO* Mäuse. Positive Ki-67 Färbung in 10/40facher Vergrößerung von **(A)** Hepatozyten und **(C)** nichtparenchymalen Zellen unterteilt in die Bereiche der Zentralvenen (Zentral), Portalvenen (Portal) und den midzonalen Bereich (Midzonal). In **(B)** und **(D)** werden die Bereiche zusammengefasst. Zwei und vier Wochen nach Behandlung der *isMdr2KO* Mäuse.

In der Gruppe der *isMdr2KO* Mäuse mit zwei aufeinanderfolgenden Injektionen lässt sich weder eine erhöhte Proliferation der Hepatozyten noch der nichtparenchymalen Zellen nachweisen (Abbildung 3.6.2). Im Vergleich zu den einfach injizierten *isMdr2KO* Mäusen weisen die Kontrollen bereits mehr Ki-67 positive Zellen auf (Abbildung 3.6.2B,D).

Auch in der Gruppe der *nisMdr2KO* Mäuse ist keine signifikante Veränderung zu beobachten. Die Hepatozyten der nicht-immunsupprimierten Tiere weisen im Bereich der Zentralvenen eine leicht verminderte Proliferationsrate auf, bei den nichtparenchymatösen Zellen ist allerdings eine Tendenz einer vermehrten Zellteilung zu sehen (Abbildung 3.6.3).

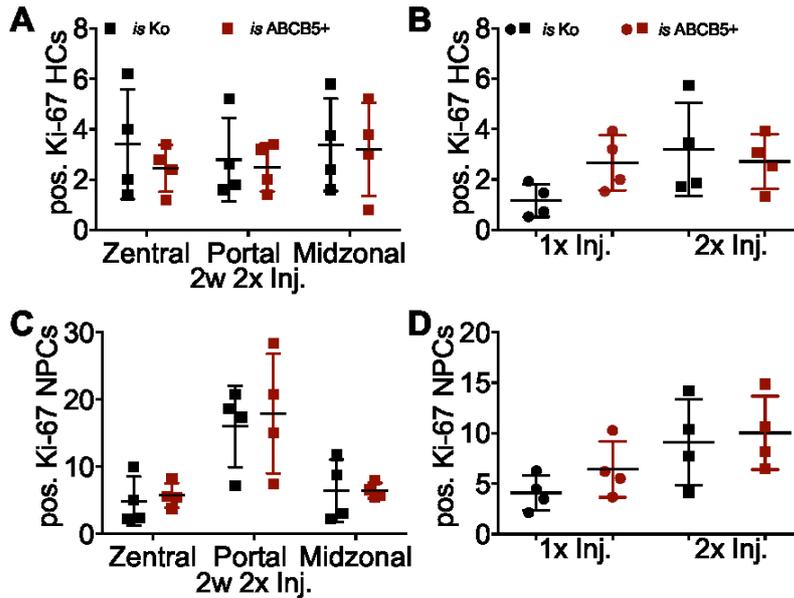


Abbildung 3.6.2: Proliferation der Leberzellen der *isMdr2KO* Mäuse nach zwei Injektionen. Positive Ki-67 (A) Hepatozyten (HCs) und (C) nichtparenchymaler Zellen (NPCs) unterteilt in die Bereiche der Zentralvenen (Zentral), Portalvenen (Portal) und den midzonalen Bereich (Midzonal). In (B) und (D) werden die Bereiche zusammengefasst.

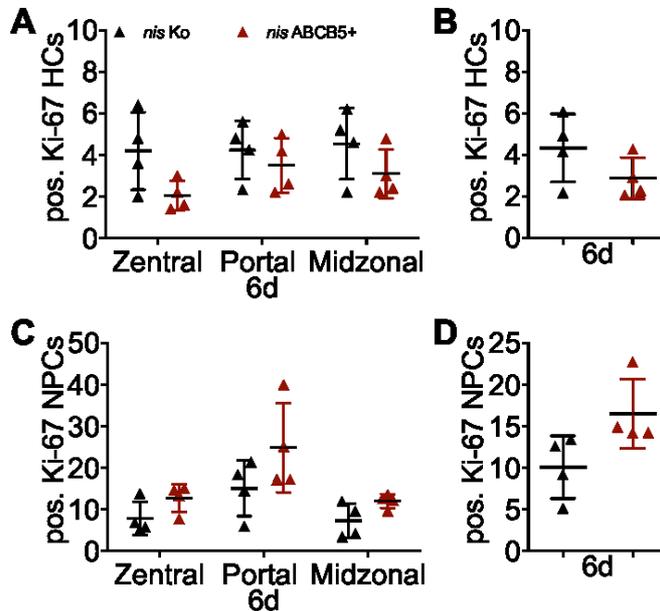


Abbildung 3.6.3: Proliferation der Leberzellen der *nisMdr2KO* Mäuse. Positive Ki-67 (A) Hepatozyten und (C) nichtparenchymaler Zellen unterteilt in die Bereiche der Zentralvenen (Zentral), Portalvenen (Portal) und den midzonalen Bereich (Midzonal). In (B) und (D) werden die Bereiche zusammengefasst.

3.7 Apoptotische Veränderungen bei Behandlung mit ABCB5+ Zellen

Ob ABCB5+ Zellen zur Zellschädigung führen und eine vermehrte Apoptose im Lebergewebe auslösen können, kann man mit der TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP-biotin-nick-end-labeling) nachgewiesen werden. Dabei werden die Zellkerne apoptotischer Zellen angefärbt. Dies wurde nur bei den frühen Zeitpunkten gemessen, da dort die höchste Apoptoserate vermutet wurde.

Weder bei den *nisMdr2KO* Mäusen noch bei den immunkompetenten Tieren konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Doch sowohl nach zwei Tagen nach Behandlung mit ABCB5+ Zellen der *nisMdr2KO* Mäuse und stärker noch nach sechs Tagen der behandelten *isMdr2KO* Mäuse ist eine Tendenz hin zu einer reduzierten Anzahl apoptotischer Zellen zu vermerken (Abbildung 3.7).

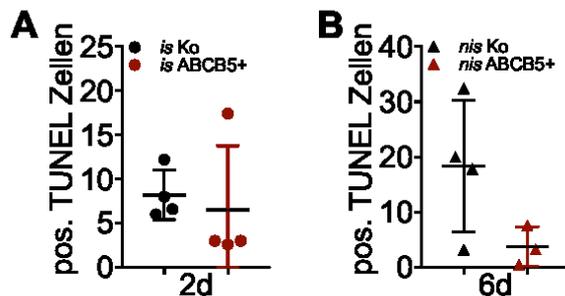


Abbildung 3.7.1: Apoptotische Zellen von (A) *isMdr2KO* Mäusen nach zwei Tagen und (B) *nisMdr2KO* Mäusen nach sechs Tagen nach Zellinjektion.

4 DISKUSSION

Die wichtigsten Erkenntnisse dieser Studie wurden bereits in der Publikation Hartwig et al. in Archives of Toxicology (2019) erläutert (IF 5,06).

Solange noch keine adäquate Therapie für ein Leberversagen gefunden wird, sterben jährlich viele Patienten an ihrer Erkrankung. Ziel dieser Studie war es, das Potenzial einer neuartigen Population mesenchymaler Stammzellen, die positiven ABCB5 Zellen, an einem Tiermodell mit einer chronischen Lebererkrankung zu untersuchen. Bei 16 bis 20 Wochen alten Mdr2KO Mäusen handelte es sich hierbei vor allem um ein Stadium der biliären Fibrose. Die Ressourcen anderer Stammzellen sind unter anderem begrenzt, vor allem bei den häufig verwendeten Knochenmarkstammzellen. Mesenchymale Stammzellen unterschiedlicher Herkunft weisen auch unterschiedliche Merkmale auf (Lv et al., 2014, Kozłowska et al., 2019), die bei den ABCB5+ Zellen, aus der Haut isoliert, noch nicht vollständig untersucht sind. Ausreichend untersucht weisen die Zellen mesenchymale Eigenschaften auf.

4.1 Mdr2KO Mäuse als Modell für Stammzelltherapie in biliärer Fibrose

Das Mausmodell der Mdr2KO Mäuse hat sich in den letzten Jahren stark etabliert. Bei einem Defekt der biliären Phospholipid- und Cholesterolsekretion entwickeln die für das Mdr2 gendefekten Mäuse eine sklerosierende Cholangitis. Die verschiedenen Stadien der daraus resultierenden Fibrose und die Progredienz der Erkrankung bis hin zur Entwicklung von HCC lassen sich anhand des Alters der Mäuse sehr gut bestimmen (Katzenellenbogen et al., 2007).

So liegt in den 16 Wochen alten Mdr2KO Mäusen eine moderate Fibrose vor, was man hier besonders gut in den Picro-Sirius-Färbungen sehen kann, was sich auch in der Arbeit von Hammad et al. zeigte (2018). Hierbei liegt ein F2 Fibrosestadium mit portoportalen Fasersepten nach Desmet et al. vor (1994). In meinen Ergebnissen fällt kein geschlechtsspezifischer Unterschied auf, was jedoch in verschiedenen Publikationen zuvor beschrieben wurde (Lammert et al., 2004, Ikenaga et al., 2015). Dort weisen die weiblichen Tiere einen höheren Kollagengehalt als die Männchen auf. Allerdings beschreiben Ikenaga et al. in ihrer Publikation, dass bei Tieren zwischen acht und zwölf Wochen der Kollagengehalt bei den männlichen Mäusen höher ist (Ikenaga et al., 2015). So ist eine Angleichung geschlechterspezifischer

Unterschiede, wie in dieser Studie beschrieben, in bestimmten Altersabschnitten denkbar.

Bei der Gabe von Therapeutika sollte sich immer die Frage stellen, wie praktikabel und reproduzierbar die Anwendung und Handhabung sind und ob eine Übertragung des Modells auf den Menschen möglich ist. Eine direkte Zellinjektion in die Leber beziehungsweise in die Lebergefäße birgt zum Beispiel ein hohes Blutungsrisiko. So ist die periphere Injektion sowohl im Mausmodell als auch in der späteren Klinik geeignet.

Zum anderen ist die Verfügbarkeit der Zellen von großer Bedeutung. Zum Teil müssen sich Spender Knochenmark entnehmen lassen, was schmerzhaft sein kann und eine höhere Infektionsgefahr birgt, als sich ein kleines Stückchen der Haut entnehmen zu lassen, für die Isolation der ABCB5+ Zellen.

Diese sind nach der Aufbereitung eingefroren jederzeit für eine allogene Zelltransplantation verfügbar. In vorangegangenen Studien wurde gezeigt, dass sich die ABCB5+ Zellen nach intravenöser Gabe nicht dauerhaft im Zielorgan ansiedeln, wie ursprünglich vermutet, sondern eine parakrine Wirkung entfalten. Dieser Effekt ist z. B. bei lokaler Gabe der ABCB5+ Zellen im Tiermodell bei chronischen Wunden aufgetreten. Dort waren die Zellen nach wenigen Tagen nicht mehr detektierbar, haben dennoch ihre Wirkung entfalten können (Vander Beken et al., 2019). In diesen Experimenten konnten die Zellen bereits nach zwei Tagen nicht in der Leber nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass die Zellen sich nur in einem ganz bestimmten Leberlappen angesiedelt haben oder sie nur ihre parakrine Wirkung, die besonders deutlich in der Fibrosereduktion ist, entfaltet haben.

Auch die Arbeitsgruppe Tietze et al. (2018) konnten keine ABCB5+ Zellen nach Injektion in die Milz nachweisen. Ob die Zellen ihre Eigenschaften verlieren oder wirklich nicht vorhanden sind, kann bis dato nicht geklärt werden. Für eine sichere Behandlung ohne Komplikationen und leichten Zugangsweg wählten wir die Schwanzvene zur Injektion.

In keiner der vorangegangenen Studien wurden den Zellen eine Toxizität nachgewiesen. Sowohl die intravenöse Gabe in die Schwanzvene (Tappenbeck et al., 2019) als auch in die Milzvene (Tietze et al., 2018) zeigten keine toxischen Reaktionen, gemessen anhand klinischen Zustands, Verhaltensweisen und Blutparameter. Auch in der von mir durchgeführten Studie der ABCB5+ Stammzellbehandlung in cholestatischen Mdr2KO Mäusen veränderten sich weder

das Verhalten, Aussehen, Blutparameter noch das Gewicht der *Mdr2KO* Mäuse. Ebenso veränderte die Stammzellbehandlung keine leberspezifischen Blutwerte im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zwar sind die leberspezifischen Blutwerte wie ALT, AST und AP von *Mdr2KO* Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Balb/c Mäusen erhöht (Reiter et al., 2016), jedoch korrelieren die genauen Werte von z. B. ALT nicht mit dem Progress der Erkrankung (Krones et al., 2015).

Die Zellen wurden auch in nicht immunsupprimierten *Mdr2KO* Mäusen (*nisMdr2KO*) getestet, da das *Mdr2KO* Modell nicht nur als Cholestase-, sondern auch als Inflammationsmodell genutzt wird (Fickert et al., 2004) und dabei konnte die sichere Gabe der Zellen bestätigt werden, da es keinen Anhalt auf Abstoßungsreaktionen oder toxische Auswirkung der Zellen gab. Auch das Verhältnis zwischen Leber- und Körpergewicht der Tiere veränderte sich nicht, was bei zunehmender Umstrukturierung des Leberparenchyms durchaus verändert sein kann. Bei den *nisMdr2KO* Mäusen lässt sich sogar eine Tendenz in die gegensätzliche Richtung beobachten, d.h. eine leichte Abnahme des Lebergewichts, da das Körpergewicht unverändert war.

Trotz der Fähigkeit von mesenchymalen Zellen sich in jede beliebige Zelle zu differenzieren, entwickeln ABCB5+ Zellen geringfügige hepatische Eigenschaften und verlieren die spezifischen Charakteristika mesenchymaler Zellen (Tietze et al., 2018). Allerdings lassen sich hepatotrope, besonders antifibrotische und immunmodulatorische Marker in der Zellkultur nachweisen. Wir konnten auch zeigen, dass ABCB5+ Zellen einen starken Einfluss auf den TGF- β Signalweg in LX-2 Zellen, humane HSCs, haben (Hartwig et al., 2019).

Die noch schwachen Effekte, aber doch vorhandenen Veränderungen der ABCB5+ Zellen der hepatischen Eigenschaften von Tietze et al. wurden in dieser Studie mit 16 Wochen alten *Mdr2KO* Mäusen geplant, um die Wirksamkeit der ABCB5+ Zellen im hepatisch kranken Organismus zu testen.

4.2 Reduktion fibrotischer Parameter mit ABCB5+ Behandlung in *Mdr2KO* Mäusen

Der Progress der Fibrose in *Mdr2KO* Mäusen ist mit fortlaufendem Alter stark ansteigend und geht einher mit einer Verringerung der Leberfunktion. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Fibrose in einem kurzen Zeitraum von zwei Wochen progredient ist, wie hier bei den *isMdr2KO* Mäusen im Alter von 18 und 20 Wochen.

Im *Mdr2KO* Mausmodell finden die Fibrosierung und der Umbau des Gewebes in den Gallenwegen statt und sind somit am stärksten an den Portalfeldern sichtbar. Genau dies konnte hier wiedergegeben werden und der maßgeblich positive Effekt der ABCB5+ Zellen war am wirksamsten. Die stärkste Reduktion des fibrotischen Umbaus konnte im Bereich der Portalvenen gezeigt werden. Besonders hier kann die Fibrosierung die Leberfunktion einschränken, da es im Besonderen zur portalen Hypertension kommen kann.

Obwohl die Reduktion der Fibrose in der Picro-Sirius-Rot-Färbung in allen Behandlungsstrategien zu sehen ist und somit die Ergebnisse als robust und verlässlich einzuordnen sind, sind die gemessenen Fibrosemarker auf Transkriptionsebene nicht reguliert. Nur bei den *nisMdr2KO* Mäusen ist eine Tendenz der Reduktion des *Col1A1* zu vermerken. Auch das Hydroxyprolin, das im Kollagen gebunden ist, ist nicht signifikant verändert. Diese Ergebnisse können sich allerdings dadurch erklären lassen, dass die Berechnungen der Methoden unterschiedlich sind. Bei der immunhistochemischen Färbung von Picro-Sirius-Rot wird immer die gleiche Anzahl an Gefäßen und Umgebung fotografiert und ausgewertet. Beim Hydroxyprolin Gehalt der Leber wird immer ein zufällig ausgewähltes Gewebestück des Lobus Caudatus mit unbekannter Anzahl an Gefäßen genutzt. So lässt sich nicht bestimmen, ob im Gewebe mehr Membranen oder Gefäße enthalten sind, die aus Kollagen bestehen. Dieses Phänomen konnte Hammad et al. (Hammad et al., 2018) mit unterschiedlicher Behandlung in *Mdr2KO* Mäusen beobachten, eine signifikante Reduktion in der Picro-Sirius-Rot-Färbung, jedoch keine erheblichen Unterschiede in der Hydroxyprolin-Messung.

Bruckner et al. (2017) konnten zeigen, dass der gesamte Hydroxyprolin Gehalt nicht entscheidend ist, sondern wo das Kollagen sich befindet. Trotz gleicher Menge an Kollagen konnte der Durchfluss der Lebergefäße durch Gabe von Stammzellen verbessert werden, wobei hier eine Reduktion am Portalfeld entscheidend ist, die hier vorliegt. Die gesamten Ergebnisse der verschiedenen Assays lassen eher auf einen Abbau der Matrix schließen als auf eine verringerte Fibrogenese.

Auch der TGF- β Signalweg spielt in Lebererkrankungen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Entwicklung von Fibrose. So können HSCs aktiviert werden und die Apoptose der Hepatozyten eingeleitet werden (Fabregat et al., 2016). In diesen Experimenten ist *Tgf β* im Gegensatz zu den Kontrollen nicht erhöht oder stärker aktiviert. Es konnte allerdings *in vitro* gezeigt werden, dass der Überstand von

ABCB5+ Zellen einen Einfluss auf diesen Signalweg hat (Hartwig et al., 2019). So verändert der Überstand den Phänotyp der humanen HSCs indem TGF- β induziert und α SMA und CTGF (Connected tissue growth factor) erhöht sind. CTGF ist an verschiedenen Lebererkrankungen beteiligt, aber auch an der Leberregeneration. So muss noch geklärt werden, welchen Einfluss positive ABCB5 Zellen auf HSCs und auf chronischen Leberschaden haben.

Aktivierte hepatische Sternzellen (HSCs) werden für die Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix (ECM) gehalten und können zu hepatischer Fibrose führen (Reeves and Friedman, 2002).

HSCs können durch die α SMA Färbung bewertet werden und sind in Mdr2KO Mäusen altersabhängig stark exprimiert. So wurde in vorangegangenen Studien gezeigt, dass vier Wochen alte Mdr2KO Mäuse mehr HSCs aufweisen als jüngere Tiere, aber auch doppelt so viele wie ältere Mdr2KO Mäuse (Popov et al., 2005). Dieses Phänomen wird dadurch erklärt, dass die HSCs die geschädigten Gallengänge vor weiterem Schaden schützen, indem sie sich zunächst aktivieren. Das geschieht hauptsächlich im periportalen Bereich. Sobald dieser Vorgang abgeschlossen ist, geht α SMA zurück und somit auch der Kollagengehalt, gemessen durch die Picro-Sirius-Rot-Färbung. Im Zeitraum dieser Experimente scheint es kaum einen Unterschied zwischen dem Alter zu geben, da α SMA sowohl in der Genexpression als auch der Färbung unverändert erscheint.

Diese Veränderung der Exprimierung könnte auch die hier vorliegenden konträren Ergebnisse zwischen α SMA Färbung und RT-PCR erklären.

Daneben hängt der HSC-positive Anteil von der jeweiligen Lebererkrankung ab. So ist dieser bei toxischen Ursachen deutlich höher als bei biliären Schäden (Mederacke et al., 2013). Es gibt des Weiteren Publikationen, in denen die Aktivierung der Sternzellen als Hauptfaktor für die Entstehung und Ablagerung von Kollagen gilt (Iwaisako et al., 2014).

4.3 Inflammatorische Antworten auf ABCB5+ Zellen der Mdr2KO Mäuse

Neben der Wirkung auf die fibrotischen Veränderungen der Leber sind auch inflammatorische Effekte von großer Bedeutung in der Fibrogenese und im Mdr2KO Modell.

ABCB5+ Zellen haben schon in anderen Modellen gezeigt, dass sie die inflammatorische Antwort von pro-inflammatorischen M1 Makrophagen in anti-

inflammatorische M2 Makrophagen verändern können. So konnte in chronischen Wunden eine Erhöhung von M2 Makrophagen wie IL-1Ra und eine Reduktion von M1 Makrophagen, z. B. IL-1 β gezeigt werden. Dabei handelte es sich jedoch um eine lokale Reaktion und nicht um ein systemisches Geschehen wie in den hier gezeigten Experimenten. Hier spielen wohl der Zeitpunkt der Untersuchungen und die Immunsuppression eine Rolle. Mit vorhandener Immunsuppression sind zwei Wochen nach Zellinjektion allgemeine/M1 Makrophagen, F4/80 Färbung, in den behandelten Tieren erhöht und die M2 Makrophagen, CD163 Färbung, unverändert. So ist eine Verschiebung nach vier Wochen zu sehen, in der M1 Makrophagen zur Kontrolle kaum verändert und M2 Makrophagen erhöht sind. In den nicht-immunsupprimierten Mdr2KO Mäusen zum frühen Zeitpunkt von sechs Tagen nach Behandlung sind M1 Makrophagen erniedrigt und vermutlich als ausbleibende Reaktion M2 Makrophagen nicht erhöht. So können wir eine leichte Verschiebung feststellen, jedoch ohne Erhöhung des vielversprechenden Interleukin-1 Rezeptorantagonisten. Dieser scheint systemisch eine kleinere Rolle als lokal exprimiert zu spielen.

Die Leukozytenanzahl in beiden Gruppen ist in der CD45 Färbung nicht verändert. Aus diesen Ergebnissen kann man schlussfolgern, dass die ABCB5+ Zellen einen Effekt auf die Inflammation der Mdr2KO Mäuse haben, allerdings weitere Untersuchungen notwendig sind, um den Prozess genau zu verstehen. Insgesamt sind Makrophagen sehr unterschiedlich in den verschiedenen Lebererkrankungen vertreten (Krenkel and Tacke, 2017) wie auch ihre Subtypen. M2 Makrophagen können die hepatische Inflammation reduzieren (Haga et al., 2017, Murphy and Selaru, 2018) und man konnte bereits feststellen, dass die Subtypen der Makrophagen zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftreten. So kann man die Erhöhung der M1 Makrophagen als Verletzungsphase und die der M2 Makrophagen als Auflösungsprozess bezeichnen (Guicciardi et al., 2018). In dieser Studie konnte ich zeigen, dass nach ABCB5+ Injektion eine Akkumulation zunächst von F4/80 positiven Zellen, danach von CD163 positiven Zellen um die Portalfelder auffällig war. Es wird vermutet, dass sich Makrophagen des Subtyps M2 positiv auf eine biliäre Fibrose auswirken, allerdings häufig erst im fortlaufenden Prozess. Damit könnte man erklären, dass CD163 zu kürzeren Zeitpunkten, nach sechs Tagen und zwei Wochen, noch nicht erhöht war, jedoch aber signifikant vier Wochen nach positiver ABCB5 Zellgabe wurde.

Interleukine repräsentieren sowohl Makrophagen der Klassen M1 als auch M2. Somit ist IL1b Vertreter der M1 Makrophagen. Diese sind proinflammatorisch, liegen aber zunächst inaktiv vor, um vom Inflammasomen Komplex mit Caspase 1 aktiviert zu werden (Tsutsui et al., 2015). Dies kann bei einigen Lebererkrankungen die inflammatorischen Reaktionen steigern, wie zum Beispiel bei der NASH (Miura et al., 2010) sowie bei der alkoholischen Steatohepatitis (Petrasek et al., 2012). *In vitro* konnte auch eine Blockierung von IL-1b durch einen IL-1 Antagonisten gezeigt werden, allerdings keine Verbesserung der Fibrose durch den Antagonisten Anakinra im *Mdr2KO* Mausmodell (Reiter et al., 2016). In der vorliegenden Studie kann allerdings kein Anstieg von IL1RA gezeigt werden, wie es bei der Behandlung von nichtheilenden Wunden (Vander Beken et al., 2019) mit ABCB5+ Zellen der Fall war. Die Genexpression immunsupprimierter *Mdr2KO* Mäuse unterscheidet sich nicht zwischen behandelten Tieren und Kontrollen.

Die nicht-immunsupprimierten Tiere weisen allerdings einen Anstieg von IL1B und IL10 in der behandelten Gruppe auf. Somit liegt eine Erhöhung beider Gruppen von Makrophagen vor. *IL1B* als pro-inflammatorischer Marker kann durch den bereits erwähnten IL1Ra blockiert werden, der auf die Leberfibrose keinen Einfluss hat (Reiter et al., 2016). Dem anti-inflammatorischen Marker IL10 konnten schon protektive Effekte auf akuten und chronischen Leberschaden nachgewiesen werden (Zhang and Wang, 2006). Interessant wäre der spätere Verlauf, um zu sehen, ob auf die beginnende Verletzungsphase eine Art Auflösungsprozess beziehungsweise ein Stillstand in den chronisch kranken *Mdr2KO* Mäusen folgt. Nach neustem Stand sind die Makrophagen in deutlich mehr Subtypen zu teilen, als es hier erfolgt ist und der Übergang ist fließend (Krenkel and Tacke, 2017). Allerdings lassen sich die Unterschiede anhand hier gemessener Parameter besser mit der Unterteilung zwischen M1 und M2 erklären. Dafür müssten noch weitere Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten, vor allem der immunkompetenten Mäuse folgen.

4.4 Das Immunsuppressivum Tacrolimus und der Effekt von Proliferation und Apoptose

Die *isMdr2KO* Mäuse wurden mit Tacrolimus, einem makrozyklischen Lakton (Venkataramanan et al., 1995) immunsupprimiert. Dieses Medikament zählt zu den Calcineurin Inhibitoren und blockiert die T-Zell Aktivierung. Es zählt zur immunsuppressiven Standardtherapie nach Organtransplantation. Ob Tacrolimus

einen zusätzlichen Effekt auf die ABCB5+ Zellen hat, ist anhand der Literatur nicht erkennbar. In einer Studie mit adipösen Stammzellen war die Proliferation vermindert (Sir et al., 2018) und bei Choi et al. (2008) konnte eine erhöhte Apoptose nachgewiesen werden. In diesen Experimenten konnte, verglichen mit den nicht-immunsupprimierten Tieren, keine Verminderung der Proliferation oder Erhöhung der Apoptose nachgewiesen werden. Bei Stammzellen isoliert aus der Gingiva wurden keine Veränderungen in der Morphologie oder Zellviabilität festgestellt (Ha et al., 2016). So müsste man die ABCB5+ Zellen mit Tacrolimus isoliert untersuchen, um einen möglichen Effekt des Immunsuppressivums auf die positiven ABCB5 Zellen zu erkennen.

Da die Proliferation eine wichtige Komponente der Regeneration der Leber ist, wurde dies auch hier untersucht. Bei den *isMdr2KO* Mäusen konnte nach zwei Wochen eine signifikante Erhöhung der positiven Hepatozyten (HPCs) auf Ki-67 festgestellt werden. Die nichtparenchymatösen Zellen (NPCs) waren zur Kontrolle nicht verändert. Die erhöhte Proliferation könnte einen positiven Einfluss auf die anderen gestressten Hepatozyten haben. Bei den *isMdr2KO* Mäusen ist die Proliferation der HPCs leicht erniedrigt, jedoch der NPCs erhöht. Auch kann man bei diesen Tieren eine Erhöhung von *TgfB1* erkennen, dies ist unter anderem auch für die Kontrolle der Proliferation verantwortlich. In gesundem Zustand wird die Proliferation inhibiert und bei einem Leberschaden aktiviert (Su et al., 2018, Tsujino et al., 2017).

Zusätzlich liegt in den frühen Zeitpunkten, nach zwei und sechs Tagen nach Injektion mit ABCB5+ Zellen eine Verminderung der Apoptose vor.

Insgesamt sind es wenige positive Zellen, weswegen es schwierig ist, die verschiedenen Gruppen zu vergleichen. Allerdings wurden ähnliche Beobachtungen bei einer Therapie mit MSCs aus dem Knochenmark bei einem CCl₄ verursachtem Leberschaden gemacht: Eine verminderte Apoptose, eine Erhöhung von Ki-67 und eine deutliche Verbesserung der chronischen Leberfibrose (Huang et al., 2016). Diese Ergebnisse konnten auch hier in den Experimenten gezeigt werden.

4.5 Positive ABCB5 Zellen im chronischen Leberschaden

Durch eine einmalige beziehungsweise zweifache intravenöse Injektion der ABCB5+ Zellen konnten verschiedene Veränderungen im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit NaCl erzielt werden. Der Rückgang des Kollagengehalts in der Picro-Sirius-Rot-Färbung und ein Einfluss auf Inflammationsparameter konnten in allen Gruppen

gezeigt werden. Allerdings ist die genaue Auswertung bei einer kleinen Tieranzahl schwierig. Das Ziel war es, möglichst verschiedene Zeitpunkte zu messen, um herauszufinden, wann der Nutzen der Zellen am höchsten ist und ob die Immunsuppression notwendig ist beziehungsweise die Wirkung der Zellen so inhibiert. Eine systemische Schwanzveneninjektion zur Behandlung von Lebererkrankungen ist etabliert, jedoch werden immer noch andere Wege wie eine Injektion in die Milz oder in die Portalvene bevorzugt. Die Zellgabe über die Schwanzvene ist ein sehr sicheres Verfahren ohne große Komplikationen und lässt sich translational gut auf den Menschen übertragen. Noch ist ungeklärt, welchen Einfluss die Zellen haben und ob die notwendige Dosis injiziert wurde. Brezillon et al. (2008) haben aufgezeigt, dass sich auch bei Knochenmarkstammzellen noch keine bestimmte Dosis an Zellen etabliert hat und die therapeutische Breite noch nicht ausreichend erforscht wurde. Weiter untersucht werden muss, ob die direkte Gabe der ABCB5+ Zellen oder die Zellüberstände dieser einen größeren Einfluss zeigen, da bereits vor Injektion ausreichend parakrin wirkende Faktoren ausgeschüttet wurden (Hartwig et al., 2019).

Obwohl noch weitere Investigationen folgen müssen, ist mit dieser Studie jedoch bereits die Frage beantwortet, ob aus der Haut isolierte ABCB5+ Zellen einen Einfluss auf eine erkrankte Leber haben können. Aufgrund der positiven und vielversprechenden Ergebnisse dieser Studie, hierbei steht vor allem die Reduktion der Leberfibrose im Vordergrund, wurde bereits eine klinische Studie in Phase I/IIa in die Wege geleitet, indem die Sicherheit und Wirkung von ABCB5+ Zellen bei Patienten mit akut-auf-chronischem-Leberversagen (ACLF) Patienten beurteilt werden (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03860155).

Die ABCB5+ Zellen zeigen sowohl einen Effekt auf die Fibrose als auch auf die Inflammation der Mäuse und ihrer Lebererkrankung. Da es keine Therapie der terminalen Lebererkrankungen gibt, lohnen sich weitere Untersuchungen. Der Effekt der ABCB5+ Zellen sollte genauer auf die einzelnen Leberzellen getestet werden und vor allem die inflammatorische Antwort genauer untersucht werden. Aber die Reduktion des Kollagengehalts ist stabil und vielversprechend.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl ein großer Anteil der Bevölkerung an einem Leberschaden leidet, sind die Therapiemöglichkeiten immer noch sehr begrenzt. Die Lebertransplantation als potentiell wirksame Heilung für Patienten mit Lebererkrankungen im Endstadium birgt als Strategie mehrere Nachteile, darunter hohe Kosten, lange Wartelisten und eine begrenzte Verfügbarkeit von Leberorganen. Daher wird die stammzellbasierte Therapie, die in Tiermodellen von akuten und chronischen Leberverletzungen vielversprechende Ergebnisse gezeigt hat, als alternative Option vorgestellt.

ABCB5+ mesenchymale Zellen, die aus der Hautdermis isoliert wurden, stellen eine leicht zugängliche und expandierbare Quelle für homogene Stammzell-Populationen dar. Darüber hinaus zeigten ABCB5+ Zellen bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Hornhaut- und Hautverletzungen. Bisher ist die Wirkung dieser Zellen auf Leberverletzungen noch unbekannt.

Des Weiteren konnten bislang keine auffälligen Abstoßungsreaktionen festgestellt werden. Die therapeutische Wirkung der Zellen ist vermutlich auf parakrine Effekte, statt ihrer Ansiedelung am Ort der Schädigung, zurückzuführen. So wird die positive Wirkung, während der kurzen Präsenz im Körper, hervorgerufen. Das verwendete Tiermodell, Mdr2KO Mäuse, entwickelt ab ihrer Geburt eine chronische Leberfibrose, die im Alter zur Zirrhose und später auch zum hepatozellulären Karzinom progrediert. In der aktuellen Studie wurden sechzehn Wochen alten Mdr2KO-Mäusen i.v. Injektionen von 500.000 ABCB5+ Zellen verabreicht, wobei verschiedene Versuchsaufbauten verwendet wurden. Die Auswirkungen der zellulären Therapie auf Entzündung, Fibrose, Apoptose und Proliferation wurden in den gesammelten Lebergeweben analysiert. Als Nächstes wurden die Zellen ohne Immunsuppression untersucht. ABCB5+ Zellen beeinflussten in gewissem Maße die Form der Entzündungsreaktion der Leber und reduzierten signifikant die Menge der Kollagenablagerung, wie aus der Quantifizierung der Picro-Sirius-Rot-Färbung berechnet wurde. Außerdem reduzierten die Zellen die Apoptose und verstärkte die kompensatorische Proliferation.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ABCB5+ Zellen eine sichere und praktikable Strategie zur Unterstützung der Leberregeneration darstellen und zur Reduzierung der Leberfibrose bei chronischen Lebererkrankungen beitragen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alali, J., Ramji, A., Ho, J. K., Scudamore, C. H., Erb, S. R., Cheung, E., Kopit, B., Bannon, C. A., Chung, S. W., Soos, J. G., Buczkowski, A. K., Brooks, E. M., Steinbrecher, U. P. & Yoshida, E. M. 2006. Liver transplant candidacy unsuitability: a review of the British Columbia experience. *Can J Gastroenterol*, 20, 95-9.
- Alfaifi, M., Eom, Y. W., Newsome, P. N. & Baik, S. K. 2018. Mesenchymal stromal cell therapy for liver diseases. *J Hepatol*.
- Antonucci, I., Stuppia, L., Kaneko, Y., Yu, S., Tajiri, N., Bae, E. C., Chheda, S. H., Weinbren, N. L. & Borlongan, C. V. 2011. Amniotic fluid as a rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy. *Cell Transplant*, 20, 789-95.
- Bataller, R. & Brenner, D. A. 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest*, 115, 209-18.
- Berardis, S., Dwisthi Sattwika, P., Najimi, M. & Sokal, E. M. 2015. Use of mesenchymal stem cells to treat liver fibrosis: current situation and future prospects. *World J Gastroenterol*, 21, 742-58.
- Bi, Y., Liu, X., Si, C., Hong, Y., Lu, Y., Gao, P., Yang, Y., Zhang, X., Wang, Y., Xiong, H., Duan, Z., Chen, Y. & Hong, F. 2019. Transplanted adult human hepatic stem/progenitor cells prevent histogenesis of advanced hepatic fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride. *Am J Transl Res*, 11, 2350-2358.
- Boigk, G., Stroedter, L., Herbst, H., Waldschmidt, J., Riecken, E. O. & Schuppan, D. 1997. Silymarin retards collagen accumulation in early and advanced biliary fibrosis secondary to complete bile duct obliteration in rats. *Hepatology*, 26, 643-9.
- Brezillon, N., Kremsdorf, D. & Weiss, M. C. 2008. Cell therapy for the diseased liver: from stem cell biology to novel models for hepatotropic human pathogens. *Dis Model Mech*, 1, 113-30.
- Bruckner, S., Zipprich, A., Hempel, M., Thonig, A., Schwill, F., Roderfeld, M., Roeb, E. & Christ, B. 2017. Improvement of portal venous pressure in cirrhotic rat livers by systemic treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 19, 1462-1473.
- Campbell, A., Brieva, T., Raviv, L., Rowley, J., Niss, K., Brandwein, H., Oh, S. & Karnieli, O. 2015. Concise Review: Process Development Considerations for Cell Therapy. *Stem Cells Transl Med*, 4, 1155-63.
- Cheung, P. F., Cheung, T. T., Yip, C. W., Ng, L. W., Fung, S. W., Lo, C. M., Fan, S. T. & Cheung, S. T. 2016. Hepatic cancer stem cell marker granulin-epithelin precursor and beta-catenin expression associate with recurrence in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7, 21644-57.
- Choi, S. J., You, H. S. & Chung, S. Y. 2008. Tacrolimus-induced apoptotic signal transduction pathway. *Transplant Proc*, 40, 2734-6.
- Christ, B., Bruckner, S. & Winkler, S. 2015. The Therapeutic Promise of Mesenchymal Stem Cells for Liver Restoration. *Trends Mol Med*, 21, 673-686.
- De Bari, C., Dell'accio, F., Tylzanowski, P. & Luyten, F. P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44, 1928-42.
- De Waard, N. E., Kolovou, P. E., Mcguire, S. P., Cao, J., Frank, N. Y., Frank, M. H., Jager, M. J. & Ksander, B. R. 2015. Expression of Multidrug Resistance

- Transporter ABCB5 in a Murine Model of Human Conjunctival Melanoma. *Ocul Oncol Pathol*, 1, 182-189.
- Dean, M. & Allikmets, R. 2001. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr*, 33, 475-9.
- Desmet, V. J., Gerber, M., Hoofnagle, J. H., Manns, M. & Scheuer, P. J. 1994. Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology*, 19, 1513-20.
- Deutsche Stiftung Organtransplantation. 2018. *Statistiken zur Organtransplantation* [Online]. Available: <https://www.dso.de/organspende/statistiken-berichte/organtransplantation> [Accessed].
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- Dooley, S. & Ten Dijke, P. 2012. TGF-beta in progression of liver disease. *Cell Tissue Res*, 347, 245-56.
- Dranoff, J. A. & Wells, R. G. 2010. Portal fibroblasts: Underappreciated mediators of biliary fibrosis. *Hepatology*, 51, 1438-44.
- Ellis, E. L. & Mann, D. A. 2012. Clinical evidence for the regression of liver fibrosis. *J Hepatol*, 56, 1171-80.
- Eom, Y. W., Shim, K. Y. & Baik, S. K. 2015. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med*, 30, 580-9.
- Fabregat, I., Moreno-Caceres, J., Sanchez, A., Dooley, S., Dewidar, B., Giannelli, G., Ten Dijke, P. & Consortium, I.-L. 2016. TGF-beta signalling and liver disease. *FEBS J*, 283, 2219-32.
- Fallowfield, J. A., Mizuno, M., Kendall, T. J., Constandinou, C. M., Benyon, R. C., Duffield, J. S. & Iredale, J. P. 2007. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. *J Immunol*, 178, 5288-95.
- Farawela, H. M., Khorshied, M. M., Kassem, N. M., Kassem, H. A. & Zawam, H. M. 2014. The clinical relevance and prognostic significance of adenosine triphosphate ATP-binding cassette (ABCB5) and multidrug resistance (MDR1) genes expression in acute leukemia: an Egyptian study. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140, 1323-30.
- Fickert, P., Fuchsbichler, A., Wagner, M., Zollner, G., Kaser, A., Tilg, H., Krause, R., Lammert, F., Langner, C., Zatloukal, K., Marschall, H. U., Denk, H. & Trauner, M. 2004. Regurgitation of bile acids from leaky bile ducts causes sclerosing cholangitis in Mdr2 (Abcb4) knockout mice. *Gastroenterology*, 127, 261-74.
- Fickert, P., Zollner, G., Fuchsbichler, A., Stumptner, C., Weiglein, A. H., Lammert, F., Marschall, H. U., Tsybrovskyy, O., Zatloukal, K., Denk, H. & Trauner, M. 2002. Ursodeoxycholic acid aggravates bile infarcts in bile duct-ligated and Mdr2 knockout mice via disruption of cholangioles. *Gastroenterology*, 123, 1238-51.
- Francoz, C., Belghiti, J. & Durand, F. 2007. Indications of liver transplantation in patients with complications of cirrhosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 21, 175-90.
- Frank, N. Y., Margaryan, A., Huang, Y., Schatton, T., Waaga-Gasser, A. M., Gasser, M., Sayegh, M. H., Sadee, W. & Frank, M. H. 2005. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res*, 65, 4320-33.
- Frank, N. Y., Pendse, S. S., Lapchak, P. H., Margaryan, A., Shlain, D., Doeing, C., Sayegh, M. H. & Frank, M. H. 2003. Regulation of progenitor cell fusion by

- ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. *J Biol Chem*, 278, 47156-65.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I. & Frolova, G. P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 230-47.
- Friedman, S. L., Sheppard, D., Duffield, J. S. & Violette, S. 2013. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med*, 5, 167sr1.
- Fukuchi, Y., Nakajima, H., Sugiyama, D., Hirose, I., Kitamura, T. & Tsuji, K. 2004. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*, 22, 649-58.
- Gonzalez, G., Sasamoto, Y., Ksander, B. R., Frank, M. H. & Frank, N. Y. 2018. Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 7.
- Grimm, M., Krimmel, M., Polligkeit, J., Alexander, D., Munz, A., Kluba, S., Keutel, C., Hoffmann, J., Reinert, S. & Hoefert, S. 2012. ABCB5 expression and cancer stem cell hypothesis in oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 48, 3186-97.
- Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortessidis, A. & Simmons, P. J. 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*, 116, 1827-35.
- Guicciardi, M. E., Trussoni, C. E., Krishnan, A., Bronk, S. F., Lorenzo Pisarello, M. J., O'hara, S. P., Splinter, P. L., Gao, Y., Vig, P., Revzin, A., Larusso, N. F. & Gores, G. J. 2018. Macrophages contribute to the pathogenesis of sclerosing cholangitis in mice. *J Hepatol*, 69, 676-686.
- Guo, Q., Grimmig, T., Gonzalez, G., Giobbie-Hurder, A., Berg, G., Carr, N., Wilson, B. J., Banerjee, P., Ma, J., Gold, J. S., Nandi, B., Huang, Q., Waaga-Gasser, A. M., Lian, C. G., Murphy, G. F., Frank, M. H., Gasser, M. & Frank, N. Y. 2018. ATP-binding cassette member B5 (ABCB5) promotes tumor cell invasiveness in human colorectal cancer. *J Biol Chem*, 293, 11166-11178.
- Ha, D. H., Yong, C. S., Kim, J. O., Jeong, J. H. & Park, J. B. 2016. Effects of tacrolimus on morphology, proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells derived from gingiva tissue. *Mol Med Rep*, 14, 69-76.
- Haga, H., Yan, I. K., Takahashi, K., Matsuda, A. & Patel, T. 2017. Extracellular Vesicles from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Survival from Lethal Hepatic Failure in Mice. *Stem Cells Transl Med*, 6, 1262-1272.
- Haldar, D., Henderson, N. C., Hirschfield, G. & Newsome, P. N. 2016. Mesenchymal stromal cells and liver fibrosis: a complicated relationship. *FASEB J*, 30, 3905-3928.
- Hammad, S., Cavalcanti, E., Werle, J., Caruso, M. L., Dropmann, A., Ignazzi, A., Ebert, M. P., Dooley, S. & Giannelli, G. 2018. Galunisertib modifies the liver fibrotic composition in the Abcb4Ko mouse model. *Arch Toxicol*, 92, 2297-2309.
- Hartwig, V., Dewidar, B., Lin, T., Dropmann, A., Ganss, C., Kluth, M. A., Tappenbeck, N., Tietze, L., Christ, B., Frank, M., Vogelmann, R., Ebert, M. P. A. & Dooley, S. 2019. Human skin-derived ABCB5(+) stem cell injection improves liver disease parameters in Mdr2KO mice. *Arch Toxicol*, 93, 2645-2660.
- Heimerl, S., Bosserhoff, A. K., Langmann, T., Ecker, J. & Schmitz, G. 2007. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma Res*, 17, 265-73.

- Huang, B., Cheng, X., Wang, H., Huang, W., La Ga Hu, Z., Wang, D., Zhang, K., Zhang, H., Xue, Z., Da, Y., Zhang, N., Hu, Y., Yao, Z., Qiao, L., Gao, F. & Zhang, R. 2016. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively. *J Transl Med*, 14, 45.
- Hulley, E. B., Welch, K. D., Appel, A. M., Dubois, D. L. & Bullock, R. M. 2013. Rapid, reversible heterolytic cleavage of bound H₂. *J Am Chem Soc*, 135, 11736-9.
- Ikenaga, N., Liu, S. B., Sverdlov, D. Y., Yoshida, S., Nasser, I., Ke, Q., Kang, P. M. & Popov, Y. 2015. A new Mdr2(-/-) mouse model of sclerosing cholangitis with rapid fibrosis progression, early-onset portal hypertension, and liver cancer. *Am J Pathol*, 185, 325-34.
- Iredale, J. P. 2007. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*, 117, 539-48.
- Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T. J., Park, T. J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y. H., Meng, F., Asagiri, M., Murray, L. A., Hofmann, A. F., Iida, T., Glass, C. K., Brenner, D. A. & Kisseleva, T. 2014. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, E3297-305.
- Jacquemin, E. 2001. Role of multidrug resistance 3 deficiency in pediatric and adult liver disease: one gene for three diseases. *Semin Liver Dis*, 21, 551-62.
- Jamall, I. S., Finelli, V. N. & Que Hee, S. S. 1981. A simple method to determine nanogram levels of 4-hydroxyproline in biological tissues. *Anal Biochem*, 112, 70-5.
- Jiang, D., Muschhammer, J., Qi, Y., Kugler, A., De Vries, J. C., Saffarzadeh, M., Sindrilaru, A., Beken, S. V., Wlaschek, M., Kluth, M. A., Ganss, C., Frank, N. Y., Frank, M. H., Preissner, K. T. & Scharffetter-Kochanek, K. 2016. Suppression of Neutrophil-Mediated Tissue Damage-A Novel Skill of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 34, 2393-406.
- Junqueira, L. C., Bignolas, G. & Brentani, R. R. 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J*, 11, 447-55.
- Katzenellenbogen, M., Mizrahi, L., Pappo, O., Klopstock, N., Olam, D., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Domany, E., Galun, E. & Goldenberg, D. 2007. Molecular mechanisms of liver carcinogenesis in the mdr2-knockout mice. *Mol Cancer Res*, 5, 1159-70.
- Kerstan, A., Niebergall-Roth, E., Esterlechner, J., Schroder, H. M., Gasser, M., Waaga-Gasser, A. M., Goebeler, M., Rak, K., Schrufer, P., Endres, S., Hagenbusch, P., Kraft, K., Dieter, K., Ballikaya, S., Stemler, N., Sadeghi, S., Tappenbeck, N., Murphy, G. F., Orgill, D. P., Frank, N. Y., Ganss, C., Scharffetter-Kochanek, K., Frank, M. H. & Kluth, M. A. 2020. Ex vivo-expanded highly pure ABCB5(+) mesenchymal stromal cells as Good Manufacturing Practice-compliant autologous advanced therapy medicinal product for clinical use: process validation and first in-human data. *Cytotherapy*.
- Kleffel, S., Lee, N., Lezcano, C., Wilson, B. J., Sobolewski, K., Saab, K. R., Mueller, H., Zhan, Q., Posch, C., Elco, C. P., Dorosario, A., Garcia, S. S., Thakuria, M., Wang, Y. E., Wang, L. C., Murphy, G. F., Frank, M. H. & Schatton, T. 2016. ABCB5-Targeted Chemoresistance Reversal Inhibits Merkel Cell Carcinoma Growth. *J Invest Dermatol*, 136, 838-46.
- Klicks, J., Masslo, C., Kluth, A., Rudolf, R. & Hafner, M. 2019. A novel spheroid-based co-culture model mimics loss of keratinocyte differentiation, melanoma

- cell invasion, and drug-induced selection of ABCB5-expressing cells. *BMC Cancer*, 19, 402.
- Kozłowska, U., Krawczenko, A., Futoma, K., Jurek, T., Rorat, M., Patrzalek, D. & Klimczak, A. 2019. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues. *World J Stem Cells*, 11, 347-374.
- Krenkel, O. & Tacke, F. 2017. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*, 17, 306-321.
- Krones, E., Erwa, W., Trauner, M. & Fickert, P. 2015. Serum alkaline phosphatase levels accurately reflect cholestasis in mice. *Hepatology*, 62, 981-3.
- Ksander, B. R., Kolovou, P. E., Wilson, B. J., Saab, K. R., Guo, Q., Ma, J., Mcguire, S. P., Gregory, M. S., Vincent, W. J., Perez, V. L., Cruz-Guilloty, F., Kao, W. W., Call, M. K., Tucker, B. A., Zhan, Q., Murphy, G. F., Lathrop, K. L., Alt, C., Mortensen, L. J., Lin, C. P., Zieske, J. D., Frank, M. H. & Frank, N. Y. 2014. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature*, 511, 353-7.
- Lammert, F., Wang, D. Q., Hillebrandt, S., Geier, A., Fickert, P., Trauner, M., Matern, S., Paigen, B. & Carey, M. C. 2004. Spontaneous cholecysto- and hepatolithiasis in Mdr2^{-/-} mice: a model for low phospholipid-associated cholelithiasis. *Hepatology*, 39, 117-28.
- Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L. & Chen, T. H. 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103, 1669-75.
- Lee, U. E. & Friedman, S. L. 2011. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 25, 195-206.
- Leipziger, J. 2021. *Leber*, Duale Reihe Physiologie Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R et al.
- Liu, W. H., Song, F. Q., Ren, L. N., Guo, W. Q., Wang, T., Feng, Y. X., Tang, L. J. & Li, K. 2015. The multiple functional roles of mesenchymal stem cells in participating in treating liver diseases. *J Cell Mol Med*, 19, 511-20.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- Luo, X. Y., Meng, X. J., Cao, D. C., Wang, W., Zhou, K., Li, L., Guo, M. & Wang, P. 2019. Transplantation of bone marrow mesenchymal stromal cells attenuates liver fibrosis in mice by regulating macrophage subtypes. *Stem Cell Res Ther*, 10, 16.
- Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M. & Leung, V. Y. 2014. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32, 1408-19.
- Margini, C., Vukotic, R., Brodosi, L., Bernardi, M. & Andreone, P. 2014. Bone marrow derived stem cells for the treatment of end-stage liver disease. *World J Gastroenterol*, 20, 9098-105.
- Mauad, T. H., Van Nieuwkerk, C. M., Dingemans, K. P., Smit, J. J., Schinkel, A. H., Notenboom, R. G., Van Den Bergh Weerman, M. A., Verkruisen, R. P., Groen, A. K., Oude Elferink, R. P. & Et Al. 1994. Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol*, 145, 1237-45.
- Mederacke, I., Hsu, C. C., Troeger, J. S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D. H., Pradere, J. P. & Schwabe, R. F. 2013. Fate tracing reveals hepatic stellate

- cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun*, 4, 2823.
- Mehal, W. Z. & Schuppan, D. 2015. Antifibrotic therapies: moving towards clinical translation *Sem Liver Dis*.
- Meier, R. P., Muller, Y. D., Morel, P., Gonelle-Gispert, C. & Buhler, L. H. 2013. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem Cell Res*, 11, 1348-64.
- Miura, K., Kodama, Y., Inokuchi, S., Schnabl, B., Aoyama, T., Ohnishi, H., Olefsky, J. M., Brenner, D. A. & Seki, E. 2010. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*, 139, 323-34 e7.
- Morita, S. Y. & Terada, T. 2014. Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *Biomed Res Int*, 2014, 954781.
- Murphy, A. G. & Selaru, F. M. 2018. Extracellular vesicles as novel therapeutics in hepatic failure. *Hepatology*, 67, 1158-1160.
- Nicolas, C. T., Wang, Y. & Nyberg, S. L. 2016. Cell therapy in chronic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 32, 189-94.
- Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J. P. & Fallowfield, J. A. 2014. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*, 14, 181-94.
- Petrasek, J., Bala, S., Csak, T., Lippai, D., Kodys, K., Menashy, V., Barrieau, M., Min, S. Y., Kurt-Jones, E. A. & Szabo, G. 2012. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J Clin Invest*, 122, 3476-89.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E. & Ben-Neriah, Y. 2004. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431, 461-6.
- Pinzani, M. 2015. Pathophysiology of Liver Fibrosis. *Dig Dis*, 33, 492-7.
- Pinzani, M. & Macias-Barragan, J. 2010. Update on the pathophysiology of liver fibrosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 4, 459-72.
- Popov, Y., Patsenker, E., Fickert, P., Trauner, M. & Schuppan, D. 2005. Mdr2 (Abcb4)-/- mice spontaneously develop severe biliary fibrosis via massive dysregulation of pro- and antifibrogenic genes. *J Hepatol*, 43, 1045-54.
- Popov, Y., Sverdlov, D. Y., Sharma, A. K., Bhaskar, K. R., Li, S., Freitag, T. L., Lee, J., Dieterich, W., Melino, G. & Schuppan, D. 2011. Tissue transglutaminase does not affect fibrotic matrix stability or regression of liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*, 140, 1642-52.
- Prockop, D. J. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-4.
- Prockop, D. J., Brenner, M., Fibbe, W. E., Horwitz, E., Le Blanc, K., Phinney, D. G., Simmons, P. J., Sensebe, L. & Keating, A. 2010. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy*, 12, 576-8.
- Puchtler, H., Waldrop, F. S. & Valentine, L. S. 1973. Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red FBA. *Beitr Pathol*, 150, 174-87.
- Rappaport, A. M., Macphee, P. J., Fisher, M. M. & Phillips, M. J. 1983. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 402, 107-37.
- Reeves, H. L. & Friedman, S. L. 2002. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci*, 7, d808-26.

- Reiter, F. P., Wimmer, R., Wottke, L., Artmann, R., Nagel, J. M., Carranza, M. O., Mayr, D., Rust, C., Fickert, P., Trauner, M., Gerbes, A. L., Hohenester, S. & Denk, G. U. 2016. Role of interleukin-1 and its antagonism of hepatic stellate cell proliferation and liver fibrosis in the *Abcb4(-/-)* mouse model. *World J Hepatol*, 8, 401-10.
- Riedl, J., Pickett-Leonard, M., Eide, C., Kluth, M. A., Ganss, C., Frank, N. Y., Frank, M. H., Ebens, C. L. & Tolar, J. 2021. ABCB5+ dermal mesenchymal stromal cells with favorable skin homing and local immunomodulation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa treatment. *Stem Cells*.
- Rousseau, N., Pige, R., Cohen, R. & Pecquet, M. 2016. What is the acceptable hemolysis index for the measurements of plasma potassium, LDH and AST? *Ann Biol Clin (Paris)*, 74, 323-8.
- Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H. & Okita, K. 2004. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 40, 1304-11.
- Schatton, T. & Frank, M. H. 2008. Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 21, 39-55.
- Schatton, T., Yang, J., Kleffel, S., Uehara, M., Barthel, S. R., Schlapbach, C., Zhan, Q., Dudeney, S., Mueller, H., Lee, N., De Vries, J. C., Meier, B., Vander Beken, S., Kluth, M. A., Ganss, C., Sharpe, A. H., Waaga-Gasser, A. M., Sayegh, M. H., Abdi, R., Scharffetter-Kochanek, K., Murphy, G. F., Kupper, T. S., Frank, N. Y. & Frank, M. H. 2015. ABCB5 Identifies Immunoregulatory Dermal Cells. *Cell Rep*, 12, 1564-74.
- Scheenstra, R., Peeters, P. M., Verkade, H. J. & Gouw, A. S. 2009. Graft fibrosis after pediatric liver transplantation: ten years of follow-up. *Hepatology*, 49, 880-6.
- Schuppan, D. 2015. Liver fibrosis: Common mechanisms and antifibrotic therapies. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 39 Suppl 1, S51-9.
- Schuppan, D. & Afdhal, N. H. 2008. Liver cirrhosis. *Lancet*, 371, 838-51.
- Schuppan, D. & Kim, Y. O. 2013. Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest*, 123, 1887-901.
- Sharma, B. K., Manglik, V. & Elias, E. G. 2010. Immuno-expression of human melanoma stem cell markers in tissues at different stages of the disease. *J Surg Res*, 163, e11-5.
- Sir, G., Goker Bagca, B., Yigitturk, G., Cavusoglu, T., Biray Avci, C., Gunduz, C. & Uyanikgil, Y. 2018. Antagonistic Effect of Oxytocin and Tacrolimus Combination on Adipose Tissue - Derived Mesenchymal Stem Cells: Antagonistic effect of oxytocin and tacrolimus. *Biomed Pharmacother*, 97, 1173-1181.
- Song, A. T., Avelino-Silva, V. I., Pecora, R. A., Pugliese, V., D'albuquerque, L. A. & Abdala, E. 2014. Liver transplantation: fifty years of experience. *World J Gastroenterol*, 20, 5363-74.
- Su, B., Su, J., Zeng, Y., Ding, E., Liu, F., Tan, T., Xia, H., Wu, Y. H., Zeng, X., Ling, H., Jiang, H., Ai, X. H. & Su, Q. 2018. Diallyl disulfide inhibits TGFbeta1-induced upregulation of Rac1 and beta-catenin in epithelial-mesenchymal transition and tumor growth of gastric cancer. *Oncol Rep*, 39, 2797-2806.
- Tacke, F. & Trautwein, C. 2015. Mechanisms of liver fibrosis resolution. *J Hepatol*, 63, 1038-9.

- Tan, C. Y., Lai, R. C., Wong, W., Dan, Y. Y., Lim, S. K. & Ho, H. K. 2014. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Res Ther*, 5, 76.
- Tang, W. P., Akahoshi, T., Piao, J. S., Narahara, S., Murata, M., Kawano, T., Hamano, N., Ikeda, T. & Hashizume, M. 2015. Basic fibroblast growth factor-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion to ameliorate liver cirrhosis via paracrine hepatocyte growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*, 30, 1065-74.
- Tappenbeck, N., Schroder, H. M., Niebergall-Roth, E., Hassinger, F., Dehio, U., Dieter, K., Kraft, K., Kerstan, A., Esterlechner, J., Frank, N. Y., Scharffetter-Kochanek, K., Murphy, G. F., Orgill, D. P., Beck, J., Frank, M. H., Ganss, C. & Kluth, M. A. 2019. In vivo safety profile and biodistribution of GMP-manufactured human skin-derived ABCB5-positive mesenchymal stromal cells for use in clinical trials. *Cytotherapy*, 21, 546-560.
- Theeuwes, F. & Yum, S. I. 1976. Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann Biomed Eng*, 4, 343-53.
- Tietze, L., Winkler, S., Hempel, M., Kluth, M. A., Tappenbeck, N., Ganss, C., Dooley, S. & Christ, B. 2018. Assessment of the hepatocytic differentiation ability of human skin-derived ABCB5(+) stem cells. *Exp Cell Res*.
- Torok, N. J. 2008. Recent advances in the pathogenesis and diagnosis of liver fibrosis. *J Gastroenterol*, 43, 315-21.
- Trautwein, C., Friedman, S. L., Schuppan, D. & Pinzani, M. 2015. Hepatic fibrosis: Concept to treatment. *J Hepatol*, 62, S15-24.
- Tsujino, K., Reed, N. I., Atakilit, A., Ren, X. & Sheppard, D. 2017. Transforming growth factor-beta plays divergent roles in modulating vascular remodeling, inflammation, and pulmonary fibrosis in a murine model of scleroderma. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 312, L22-L31.
- Tsutsui, H., Cai, X. & Hayashi, S. 2015. Interleukin-1 Family Cytokines in Liver Diseases. *Mediators Inflamm*, 2015, 630265.
- Van Der Helm, D., Barnhoorn, M. C., De Jonge-Muller, E. S. M., Molendijk, I., Hawinkels, L., Coenraad, M. J., Van Hoek, B. & Verspaget, H. W. 2019. Local but not systemic administration of mesenchymal stromal cells ameliorates fibrogenesis in regenerating livers. *J Cell Mol Med*.
- Vander Beken, S., De Vries, J. C., Meier-Schiesser, B., Meyer, P., Jiang, D., Sindrilaru, A., Ferreira, F. F., Hainzl, A., Schatz, S., Muschhammer, J., Scheurmann, N. J., Kampilafkos, P., Seitz, A. M., Durselen, L., Ignatius, A., Kluth, M. A., Ganss, C., Wlaschek, M., Singh, K., Maity, P., Frank, N. Y., Frank, M. H. & Scharffetter-Kochanek, K. 2019. Newly Defined ATP-Binding Cassette Subfamily B Member 5 Positive Dermal Mesenchymal Stem Cells Promote Healing of Chronic Iron-Overload Wounds via Secretion of Interleukin-1 Receptor Antagonist. *Stem Cells*, 37, 1057-1074.
- Vanderlaan, M. & Phares, W. 1981. gamma-Glutamyltranspeptidase: a tumour cell marker with a pharmacological function. *Histochem J*, 13, 865-77.
- Venkataramanan, R., Swaminathan, A., Prasad, T., Jain, A., Zuckerman, S., Warty, V., Mcmichael, J., Lever, J., Burckart, G. & Starzl, T. 1995. Clinical pharmacokinetics of tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*, 29, 404-30.
- Volpicelli, E. R., Lezcano, C., Zhan, Q., Girouard, S. D., Kindelberger, D. W., Frank, M. H., Frank, N. Y., Crum, C. P. & Murphy, G. F. 2014. The multidrug-resistance transporter ABCB5 is expressed in human placenta. *Int J Gynecol Pathol*, 33, 45-51.

- Webber, B. R., O'connor, K. T., Mcelmurry, R. T., Durgin, E. N., Eide, C. R., Lees, C. J., Riddle, M. J., Mathews, W. E., Frank, N. Y., Kluth, M. A., Ganss, C., Moriarity, B. S., Frank, M. H., Osborn, M. J. & Tolar, J. 2017. Rapid generation of Col7a1^{-/-} mouse model of recessive dystrophic epidermolysis bullosa and partial rescue via immunosuppressive dermal mesenchymal stem cells. *Lab Invest*, 97, 1218-1224.
- Weiskirchen, R. & Tacke, F. 2016. Liver Fibrosis: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Dig Dis*, 34, 410-22.
- Wilson, B. J., Saab, K. R., Ma, J., Schatton, T., Putz, P., Zhan, Q., Murphy, G. F., Gasser, M., Waaga-Gasser, A. M., Frank, N. Y. & Frank, M. H. 2014. ABCB5 maintains melanoma-initiating cells through a proinflammatory cytokine signaling circuit. *Cancer Res*, 74, 4196-207.
- Wilson, B. J., Schatton, T., Zhan, Q., Gasser, M., Ma, J., Saab, K. R., Schanche, R., Waaga-Gasser, A. M., Gold, J. S., Huang, Q., Murphy, G. F., Frank, M. H. & Frank, N. Y. 2011. ABCB5 identifies a therapy-refractory tumor cell population in colorectal cancer patients. *Cancer Res*, 71, 5307-16.
- Yang, M., Li, W., Fan, D., Yan, Y., Zhang, X., Zhang, Y. & Xiong, D. 2012. Expression of ABCB5 gene in hematological malignances and its significance. *Leuk Lymphoma*, 53, 1211-5.
- Yanguas, S. C., Cogliati, B., Willebrords, J., Maes, M., Colle, I., Van Den Bossche, B., De Oliveira, C., Andraus, W., Alves, V. a. F., Leclercq, I. & Vinken, M. 2016. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol*, 90, 1025-1048.
- Zhang, C. Y., Yuan, W. G., He, P., Lei, J. H. & Wang, C. X. 2016. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol*, 22, 10512-10522.
- Zhang, L. J. & Wang, X. Z. 2006. Interleukin-10 and chronic liver disease. *World J Gastroenterol*, 12, 1681-5.
- Zhou, W. C., Zhang, Q. B. & Qiao, L. 2014. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol*, 20, 7312-24.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. & Hedrick, M. H. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7, 211-28.

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 2.1: RT-PCR Zyklus	27
Tabelle 2.2: Sequenzen von Primerpaaren für die Real-time PCR.....	27
Tabelle 2.3: Prozess der Paraffineinbettung	28
Tabelle 2.4: Antikörper für immunhistochemische Färbungen.....	30

8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.3.1: Lebertransplantationen der letzten fünf Jahre in Deutschland.....	6
Abbildung 1.3.2: Mechanismen von MSCs	7
Abbildung 2.2.1: Versuchsaufbau	22
Abbildung 2.2.2: Osmotische Pumpen	23
Abbildung 2.2.3: Pumpenimplantation der Mdr2KO Mäuse.....	24
Abbildung 3.1.1 A-D: Körpergewicht der Mdr2KO Mäuse im Behandlungsverlauf. ...	34
Abbildung 3.1.2 A-C: Verhältnis von Lebergewicht zum Körpergewicht der Mdr2KO Mäuse.....	35
Abbildung 3.2.1 A-D: Typische Leberwerte der isMdr2KO Mäuse zwei Tage, zwei und vier Wochen nach Behandlung.....	36
Abbildung 3.2.2 A-D: Typische Leberparameter der isMdr2KO Mäuse mit zwei Injektionen.	36
Abbildung 3.2.3 A-D: Typische Leberparameter der nisMdr2KO Mäuse.	37
Abbildung 3.3.1 A-C: Picro-Sirius-Rot Färbung der isMdr2KO Mäuse.	38
Abbildung 3.3.2 D-G: Picro-Sirius-Rot-Färbung der (D-E) isMdr2KO Mäuse und (F-G) nisMdr2KO Mäuse.....	39
Abbildung 3.3.3: Hydroxyprolinegehalt in den Lebern der Mdr2KO Tiere.....	40
Abbildung 3.3.4 A-D: Genexpressionsmessung fibrotischer Zytokine mittels semi-quantitativer Realtime PCR in isMdr2KO Mäusen.	41
Abbildung 3.3.5 Genexpressionsmessung fibrotischer Zytokine isMdr2KO Mäusen mit einer und zwei Injektionen.	41
Abbildung 3.3.6: Genexpressionsmessung fibrotischer Zytokine in nisMdr2KO.....	42
Abbildung 3.4.1: Aktivierung der Sternzellen.	43
Abbildung 3.4.2: Fibroblasten Färbung mit SM22 α	44
Abbildung 3.5.1: Inflammationsmarker in Mdr2KO Mäusen.....	46
Abbildung 3.5.2: Inflammationsmarker CD163 und CD45 in isMdr2KO Mäusen mit zweifacher Injektion von ABCB5+ Zellen nach 2 Wochen.....	47
Abbildung 3.5.3: Inflammationsmarker in nisMdr2KO Mäusen.....	48
Abbildung 3.5.4 (A-E): Genexpressionsmessung inflammatorischer Zytokine in isMdr2KO.....	49

Abbildung 4.5.5: Genexpressionsmessung inflammatorischer Zytokine in <i>isMdr2KO</i> mit einer und zwei Injektionen.....	47
Abbildung 3.5.6: Genexpressionsmessung inflammatorischer Zytokine in <i>nisMdr2KO</i>	50
Abbildung 3.6.1 A-D: Proliferation der Leberzellen der <i>isMdr2KO</i> Mäuse.	51
Abbildung 3.6.2: Proliferation der Leberzellen der <i>isMdr2KO</i> Mäuse nach zwei Injektionen.	52
Abbildung 3.6.3: Proliferation der Leberzellen der <i>nisMdr2KO</i> Mäuse.	52
Abbildung 3.7.1: Apoptotische Zellen.	53

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname Hartwig, Vanessa
 Geburtsdatum: 11.08.1992
 Geburtsort: Mannheim
 Familienstand: ledig
 Vater: Uwe Hartwig
 Mutter: Claudia Hartwig

SCHULISCHER WERDEGANG

2002 – 2011 Karl-Friedrich-Gymnasium Mannheim
 27.05.2011 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

2012 – 2014	Beginn des Studiums Humanmedizin, Universität zu Köln
19.03.2014	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2014 – 2017	Hauptstudium, Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg
12.10.2017	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
2018 – 2019	Praktisches Jahr, Universität Heidelberg
22.05.2019	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
Seit 15.02.2020	Assistenzärztin für Viszeralchirurgie

10 DANKSAGUNG

Herrn Steven Dooley danke ich für die Überlassung des spannenden Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, dieses zu bearbeiten.

Besonderen Dank schulde ich meiner gesamten Arbeitsgruppe, die mich herzlich aufgenommen hat und mir zu jeder Zeit eine große Hilfe war.

Ebenso danke ich Frau Anne Dropmann für die Unterstützung im Labor und darüber hinaus. Vorallem für Durchsicht meiner Arbeit und die vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer an mich geglaubt haben.