

Aus
der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfram T. Knoefel

**Die Rolle der Thrombozyten für das frühe Homing CD 133⁺
Knochenmarkstammzellen entlang des murinen dermalen und hepatisch-
sinusoidalen Endothels**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Julian Philipp Kirchner

2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Schulte am Esch

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Keitel-Anselmino

Meinen Eltern, Andrea & Bernd

Meinen Geschwistern, Jana & Nele

Meiner Liebe, Inga

I. Zusammenfassung

Hintergrund

In ersten klinischen Erfahrungen konnte das therapeutische Potential hämatopoetischer CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen (CD 133⁺ KMSZ) im Rahmen der Leberregeneration nach Leberteileresektionen nachgewiesen werden. Die zugrunde liegende Hypothese beinhaltet die Abkürzung der physiologisch stattfindenden Mobilisierung von peripheren Knochenmarkstammzellen mit konsekutiver Ansiedlung in der geschädigten Leber. Darüber hinaus wird ein positiver Effekt von Thrombozyten auf das *Homing* von CD 133⁺ KMSZ entlang des Endothels vermutet, der in vorangegangenen Versuchen unserer Arbeitsgruppe in einem humanen System unter *shear stress* nachgewiesen wurde.

Ziele

Um die Grundlagen für murine *Knock-out* Modelle zu legen, soll das etablierte humane auf ein murines Modell übertragen werden. In einem ersten Schritt wird die Rolle der Thrombozyten im Allgemeinen sowie P-Selectin im Speziellen für das *Homing* der CD 133⁺ KMSZ in der Maus verifiziert. Desweiteren soll ein leberspezifisches Modell etabliert werden, um die Effekte entlang sinusoidaler Endothelzellen zu untersuchen.

Methoden

Kommerziell erhältliche C57BL/6 mouse primary dermal endothelial cells (dMEC) und mouse liver sinusoidal endothelial cells (mLSEC) wurden in Kanälen eines *Live Cell Imaging Systems* unter Fluss kultiviert. Primäre CD 133⁺ KMSZ wurden mittels FACS-Sorting aus ausgespültem Knochenmark der murinen Tibiae und Femora gewonnen. dMEC oder mLSEC wurden unter *shear stress* mit 1 dyne mit *platelet rich plasma* (PRP) oder *platelet poor plasma* (PPP) der murinen KMSZ Spender co-inubiert. Der Effekt stimulierter Thrombozyten auf die Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ wurde untersucht, indem das murine PRP mittels ADP voraktiviert wurde. Mittels Lichttransmission-Aggregometrie nach Bohr wurde die Aktivierung kontrolliert. In einem weiteren Versuch wurde das thrombozytäre P-Selektin spezifisch mit dem chemischen Antagonisten KF 38789 geblockt.

Ergebnisse

Die Co-Inkubation muriner CD 133⁺ KMSZ mit PRP führte zu einer Steigerung der Adhäsion entlang der dMEC unter *shear stress* auf 144 % (+/- 17% StdDev; p<0,005) im Vergleich zur Co-Inkubation mit PPP. Eine Voraktivierung der Thrombozyten mittels ADP führte im Vergleich zu unstimulierten Thrombozyten zu einer weiteren, nicht signifikanten Steigerung der Adhäsion. Die P-Selektin Blockierung hatte einen ebenfalls nicht signifikanten Trend zur Steigerung der Adhäsion CD 133⁺ KMSZ auf 132% (+/- 35% StdDev) zur Folge. Analog zu den Ergebnissen entlang der dMEC zeigte sich auch entlang der mLSEC eine Steigerung der CD 133⁺ KMSZ Adhäsion bei der Co-Inkubation mit unstimuliertem PRP auf 131% (+/- 9% StdDev; p<0,05).

Schlussfolgerung

Thrombozyten fördern analog zum humanen Modell die Adhäsion CD 133⁺ KMSZ entlang murinem dermalen Mikro-Endothel. Die Aktivierung der Thrombozyten scheint dabei ebenso wie die thrombozytäre P-Selektin Expression nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Darüber hinaus konnte diese Interaktion auch für hepatische SEC verifiziert werden. Diese Daten legen nahe, dass der gezielte Einsatz von Thrombozyten ein neuer Angriffspunkt zur Verbesserung der therapeutischen Strategien im Rahmen ausgeprägter Leberteileresektionen sein könnte.

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dMEC	<i>C57BL/6 Mouse Primary Dermal Endothelial Cells</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluorescein
fl	Femtoliter
FLVR	<i>Future Liver Remnant Volume</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Gauge
g	Gramm; Gravitationskraft
G ₀ , G ₁ Phase	Zellzyklusphasen
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
I.E.	Internationale Einheiten
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IL	Interleukin

kDA	Kilo Dalton
KMSZ	Knochenmarkstammzellen
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
min	Minute
ml	Mililiter
mLSEC	<i>C57BL/6 Mouse Primary Liver Sinusoidal Endothelial Cells</i>
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor-1
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PMP	<i>Platelet Derived Microparticles</i>
PPP	<i>Platelet Poor Plasma</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
PTFAR	<i>Platelet-Activating Factor Receptor</i>
PVE	Portalvenöse Embolisation
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SDF-1	<i>Stromal Cell-Derived Factor-1</i>
Src Kinase	<i>Sarcoma - Kinase</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
StdDev	<i>standard deviation</i>
t=	Zeitangabe
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U/l	<i>Units / Liter</i>
VAP-1	<i>Vascular Adhesion Protein</i>

VCAM-1 / 2	<i>Vascular Cell Adhesion Protein-1 /-2</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vWF	van-Willebrand-Faktor
µl	Microliter
µm	Micrometer

III. Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung	I
II. Abkürzungsverzeichnis	II
III. Inhaltsverzeichnis	V
IV. Abbildungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 <i>Klinische Grundlage</i>	1
1.2 <i>Die Leber</i>	2
1.2.1 Makroskopie der Leber	2
1.2.2 Mikroskopie der Leber	3
1.2.3 Endogene Leberregeneration	5
1.3 <i>Stammzellen</i>	6
1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen	6
1.3.2 Leberregeneration mittels Knochenmarkstammzellen	9
1.3.3 Mobilisierung der Knochenmarkstammzellen zur Leber	11
1.3.4 Interaktion von Knochenmarkstammzellen und Endothel	11
1.4 <i>Thrombozyten</i>	12
1.4.1 Aktivierung von Thrombozyten	14
1.4.2 Die Rolle der Thrombozyten für die Leberregeneration	15
1.5 <i>Interaktion von Stammzellen und Thrombozyten</i>	15
2 Ziele der Arbeit	17
3 Material	18
3.1 <i>Verwendeten Geräte</i>	18
3.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	18
3.3 <i>Chemikalien</i>	19
3.4 <i>Antikörper für die FACS-Analyse</i>	19
3.5 <i>Zelllinien</i>	20
3.6 <i>Zellkulturmedien</i>	20

3.7	<i>Software</i>	20
3.8	<i>Versuchstiere</i>	20
3.8.1	Genehmigung des Tierversuchprojekts	21
4	Methoden	21
4.1	<i>Isolierung & Kultivierung muriner Zellen</i>	23
4.1.1	Aufreinigung der Blutproben zur Isolation der Thrombozyten	23
4.1.2	Aufreinigung muriner CD 133 ⁺ Knochenmarkstammzellen	25
4.2	<i>FACS</i>	27
4.2.1	Grundprinzip	27
4.2.2	<i>Prinzip des Cellsorting</i>	29
4.2.3	FACS-Färbungen und Sorting Strategie	29
4.3	<i>Zellkultur</i>	30
4.3.1	Kultur adhärenter endothelialer Zellen	30
4.3.2	Passagieren von Zellen	31
4.3.3	Kryokonservierung	31
4.3.4	Reaktivierung kyrokonservierter Zellen	32
4.4	<i>Live Cell Imaging</i>	32
4.4.1	Prinzip des Bioflux 200 Systems	32
4.4.2	Anzüchten eines konfluenten, endothelialen Monolayers im Bioflux Kanal	34
4.4.3	Versuchsgruppen der Bioflux-Analyse	35
4.5	<i>Auswertung der Versuche</i>	36
4.6	<i>Statistische Auswertung</i>	37
5	Ergebnisse	38
5.1	<i>Etablierung der murinen Co-Kulturmodelle im Bioflux Live Cell Imaging System</i>	38
5.1.1	Vergleich verschiedener Beschichtungen des Bioflux-Kanals zur Anzüchtung eines Endothel-Monolayers	38
5.1.2	Aktivierung muriner Thrombozyten mittels ADP	40
5.1.3	FACS Sorting	41

5.2	<i>Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und PRP</i>	45
5.3	<i>Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und mittels ADP aktiviertem PRP</i>	46
5.4	<i>Vergleich der Adhäsionsraten von CD 133⁺ KMSZ nach Inkubation mit PRP und mittels ADP aktiviertem PRP entlang des dermalen Endothels</i>	47
5.5	<i>Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PRP und mittels KF38789 vorinkubiertem PRP</i>	48
5.6	<i>Adhäsion muriner CD133⁺ KMSZ entlang eines hepatisch-sinusoidalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und PRP</i>	49
6	Diskussion	50
6.1	<i>Das murine Co-Kulturmodell im Bioflux Live Cell Imaging System</i>	50
6.1.1	Beschichtungen des Bioflux-Kanals	51
6.1.2	Die Erythrozytenlyse ist der Phasentrennung bei der primären Aufreinigung überlegen	51
6.1.3	Murine Thrombozyten sind sensibel für ADP	52
6.1.4	Murine CD 133 ⁺ KMSZ adhärieren am murinen dermalen Mikro-Endothel	52
6.1.5	Murine CD 133 ⁺ KMSZ adhärieren am murinen hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothel	53
6.2	<i>Thrombozyten fördern die Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels</i>	54
6.3	<i>Die Aktivierung muriner Thrombozyten mittels ADP führt zu einer weiteren Steigerung der Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels</i>	56
6.4	<i>Die selektive P-Selektin Blockierung auf der Thrombozyten-Oberfläche führt zu keiner Reduktion der Adhärenz muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels</i>	57
6.5	<i>Thrombozyten fördern die Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothels</i>	59
7	Schlussfolgerung	61
V.	Literaturverzeichnis	62
VI.	Danksagung	71
VII.	Erklärung	72

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des Leberparenchyms.....	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese	7
Abbildung 3: Übersicht Methodik.....	21
Abbildung 4: Prinzip der Licht-Transmissionsaggregometrie nach Bohr.....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie und der durchflusszytometrischen Zellsortierung.....	28
Abbildung 6: Übersicht der Flusszellen des Bioflux 200 Systems in verschiedenen Vergrößerungen.	33
Abbildung 7: Konfluent mit Endothelzellen bewachsener Kanal, 20x Vergrößerung.....	35
Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung einer Auswertung; 20x Vergrößerung.	37
Abbildung 9: Vergleich der Zelladhäsion der murinen Endothelzellen in den Bioflux-Kanälen bei Verwendung unterschiedlicher Beschichtungs-Reagenzien und Konzentrationen, 20x Vergrößerung.....	39
Abbildung 10: Aktivierung muriner Thrombozyten mittels unterschiedlicher ADP - Konzentrationen	40
Abbildung 11: FACS Antikörper Tests.....	41
Abbildung 12: FACS Protokoll.....	42
Abbildung 13: Verteilung der Subpopulationen der Lymphozyten nach Phasentrennung und Erythrozytenlyse	44
Abbildung 14: Durchschnittliche Anzahl adhärenter CD 133 ⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PPP und PRP.....	45
Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl adhärenter CD 133 ⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PPP und mittels ADP aktiviertem PRP.....	46
Abbildung 16: Vergleich der Adhäsionszunahme von CD 133 ⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels nach Inkubationen von PRP und mittels ADP voraktiviertem PRP in Relation zu PPP.....	47
Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl adhärenter CD 133 KMSZ entlang des dermalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PRP und mittels KF38789 vorinkubierten PRP	48

Abbildung 18: Durchschnittliche Anzahl adhärenter CD 133+ KMSZ entlang des hepatisch-sinusoidalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PPP und PRP49

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlage

Erste klinische Erfahrungen mit einem neuartigen Konzept zur Förderung von Leberregeneration vor erweiterter Rechtsresektion der Leber legen nahe, dass Patienten zusätzlich zur portal-venösen Embolisation von einer Applikation autologer CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen (CD 133⁺ KMSZ) zur Steigerung der Proliferation des nach Hepatektomie geplant verbleibenden Leberanteils profitieren (J. S. am Esch, 2nd et al., 2005; Furst et al., 2007). Für Patienten, die aufgrund einer drohenden Leberinsuffizienz aktuell nicht operabel wären, könnte dieses Verfahren in Zukunft eine kurative Leberteileresektion ermöglichen.

Die häufigste Indikation zur Leberteileresektion sind primär und sekundär maligne Tumore der Leber. Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) macht mit einem Anteil von circa 80% den Großteil der primären Lebertumore bei Erwachsenen aus. Als sekundär maligne Lebertumore sind vor allem die kolorektalen Metastasen zu sehen. Die Behandlungsmöglichkeiten werden in den nächsten Jahren für den klinischen Alltag immer bedeutender werden.

Laut der deutschen S3-Leitlinie von Mai 2013 zur „Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms“ sollen die Karzinome, wenn möglich einer primären Resektion zugeführt und eine R0-Situation erreicht werden. Als Kriterien der Nicht-Resektabilität gelten dabei der Tumorbefall aller drei Lebervenen, die allgemeine Inoperabilität sowie eine fehlende funktionelle Reserve. Es wird jedoch explizit auf die Möglichkeit hingewiesen, dass potentiell resektable Tumore, die auf Grund eingeschränkter funktioneller Reserve nicht operabel sind, neoadjuvant behandelt werden können. Auch die S3-Leitlinie zum Koloraktalen Karzinom empfiehlt bei Lebermetastasen eine primäre Leberteilesektion oder wenn nötig zuvor eine neoadjuvanten Therapie.

Die Notwendigkeit der leitliniengerechten Tumorentfernung gepaart mit einer häufig späten Diagnosestellung, stellt für die onkologische Leberchirurgie eine große Herausforderung dar. In bis zu einem Drittel der Fälle (Halazun et al., 2007) ist eine erweiterte rechtsseitige Hepatektomie der Segmente I und IV-VIII notwendig, um tumorfreie Resektionsränder zu erhalten. Bei derart ausgeprägten Resektionen besteht

1 Einleitung

jedoch die Gefahr, dass auf Grund fehlender funktioneller Reserve Patienten hepatisch funktionell inoperabel sind. Der nach der Resektion verbleibende Leberanteil (FLVR; *future liver remnant volume*) sollte mindestens 0,5% des Körpergewichts (Schindl et al., 2005) oder 25% des initialen Lebervolumens (Truant et al., 2007) betragen. Eine etablierte Methode um das prospektive Lebervolumen zu erhöhen, ist ein zweizeitiges Vorgehen, wobei der Resektion eine portalvenöse Embolisation (PVE) vorausgeht. Der interventionelle Verschluss der später zu resezierenden Lebersegmente hat einen Wachstumsstimulus für die nach Resektion verbleibenden, portal perfundierten Segmente zur Folge (Abulkhair et al., 2008). Der Zeitraum zwischen PVE und Erreichen eines ausreichenden prospektiven Leberrestvolumen wird mit bis zu 150 Tagen (Broering et al., 2002) angegeben. Bei großen und schnell wachsenden Tumoren kann dieser Zeitabstand jedoch zu groß sein, so dass ein kurativ chirurgischer Eingriff nicht mehr möglich ist. An dieser Stelle setzt das oben beschriebene Konzept an, zu dessen besserem Verständnis und Modifikation diese Arbeit beitragen soll.

1.2 Die Leber

1.2.1 Makroskopie der Leber

Die Leber ist das größte Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers. Sie spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung des Stoffwechsels von Kohlenhydraten, Mineralien, Vitaminen und Proteinen. Ebenso ist sie Ort der Produktion von Gerinnungsfaktoren, Gallensäuren, Albumin und der an der humoralen Immunabwehr beteiligten Plasmaproteine. Für die Glukose ist die Leber Synthese- und Speicherorgan in Einem. In der Metabolisierung ausscheidungspflichtiger Substanzen deren Endprodukte über Urin und Gallenflüssigkeiten eliminiert werden nimmt die Leber eine Monopolstellung ein. Anatomisch betrachtet liegt sie im rechten Oberbauch und stellt mit ihrem Gewicht von durchschnittlich etwa 1500g die größte menschliche Drüse dar. Die Blutversorgung erfolgt über zwei Wege: Die Arteria hepatica propria entspringt aus dem Truncus coeliacus und wird zusammen mit ihren Ästen als Vasa privata bezeichnet. Zusätzlich verfügt die Leber mit der Vena portae hepatis über sogenannte Vasa publica, die nährstoffreiches Blut aus dem Magen-Darmtrakt zu den Lebersinusoiden transportieren. Die Angaben über die genauen Anteile an der Blutversorgung schwanken dabei je nach Literatur. Es steht jedoch fest, dass die Vena portae mit einem Anteil von mindestens 60% bis zu 85% den größeren Teil der Blutversorgung übernimmt. Der venöse Abfluss

1 Einleitung

erfolgt über drei große Lebervenen, die Venae hepaticae sinistra, media und dextra, welche in die Vena cava inferior münden. Eine gedachte Linie an der Rückseite der Leber (Linie von Cantile) zwischen Vena cava inferior und Gallenblase trennt die Leber in einen rechten und linken Lappen. Die innere Gliederung folgt der 1957 von Couinad veröffentlichten Einteilung, nach der die Leber in 8 Segmente eingeteilt wird. Die Einteilung folgt dabei dem Verzweigungsmuster der Leitungsbahn-Trias aus V. portae, A. hepatica propria und Gallengängen, sowie dem Verlauf der Venae hepaticae. Dabei bilden die Segmenten I-IV den linken und die Segmente V-VIII den rechten Lappen. Das Verhältnis des rechten Lappens zum linken Lappen beträgt ca. 1,5-2 zu 1.

1.2.2 Mikroskopie der Leber

Mikroskopisch besteht das Parenchym der Leber aus circa 1-1,5 Millionen Leberläppchen, den sogenannten Lobuli hepatici, welche die Form einer sechseckigen Säule aufweisen (s. Abbildung 1; Fig. A). In den Lobuli befinden sich die Zellpopulationen der Leber, die vorrangig aus Hepatozyten, *liver sinusoidal endothelial cells* (LSEC), Kupffer-Zellen, Ito-Zellen und dendritischen Zellen bestehen. An den Rändern verlaufen in den periportal Feldern die Endäste von A. hepatica, V. portae und intrahepatischen Gallengängen. Sie bilden die hepatische Trias (Glisson'sche Trias). Die Hepatozyten sind unter anderem für die Stoffwechselfunktionen der Leber verantwortlich und bilden dementsprechend den größten Teil der Population. Sie sind in den Lobuli um eine Zentralvene (V.centralis) angeordnet und werden speichenförmig von den stark verzweigten Sinusoiden (Vasa sinusoidea) durchzogen. In den Sinusoiden (s. Abbildung 1; Fig. B) vermischt sich das Blut aus A. hepatica und V. portae und erfährt auf Grund der starken Aufzweigung der Sinusoide eine Reduzierung der Fließgeschwindigkeit auf circa 70-250µm/s im Vergleich zu etwa 300µm/s in peripheren Gefäßen (MacPhee, Schmidt, & Groom, 1995). Die mit den LSEC ausgekleideten Sinusoide unterscheiden sich elementar von anderen Gefäßen, da ihnen eine Basalmembran fehlt. Die flach ausgezogenen LSEC (s. Abbildung 1; Fig. C) bilden keine durchgehende Barriere und besitzen rund 100nm große transzelluläre Poren (Wisse, De Zanger, Charels, Van Der Smissen, & McCuskey, 1985). Dies ermöglicht die Diffusion von Plasmabestandteilen, jedoch nicht von Blutzellen, in den zwischen Endothel und Hepatozyten liegenden Disse-Raum und führt zu einem maximalen Austausch zwischen Blut und Hepatozyten. Auch das Expressionsmuster von Adhäsionsmolekülen der LSEC unterscheidet sich von denen anderer Endothelzellarten.

1 Einleitung

So scheint es beispielsweise keine Expression des CD-34 -Antigens sowie zahlreicher Cadherine und Integrine zu geben (Couvelard, Scoazec, & Feldmann, 1993; Scoazec & Feldmann, 1991). Die lange Zeit bestehende Aussage, dass auch das *Platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) nicht exprimiert wird (Couvelard et al., 1993) scheint jedoch durch neuere Untersuchungen widerlegt (Neubauer, Wilfling, Ritzel, & Ramadori, 2000). In den Sinusoiden sind ebenfalls die Kupffer-, Ito- und dendritischen Zellen lokalisiert (s. Abb. 1 Fig. C). Die Kupfferzellen gehören dem Phagozyten-System an und sind gewebeständige Makrophagen, die Ito-Zellen fungieren als Fett und Vitamin-A Speicherzellen und sind hauptsächlich nah der Zentralvene zu finden. Dendritischen Zellen können in die Lymphknoten der Leber migrieren (Kudo, Matsuno, Ezaki, & Ogawa, 1997).

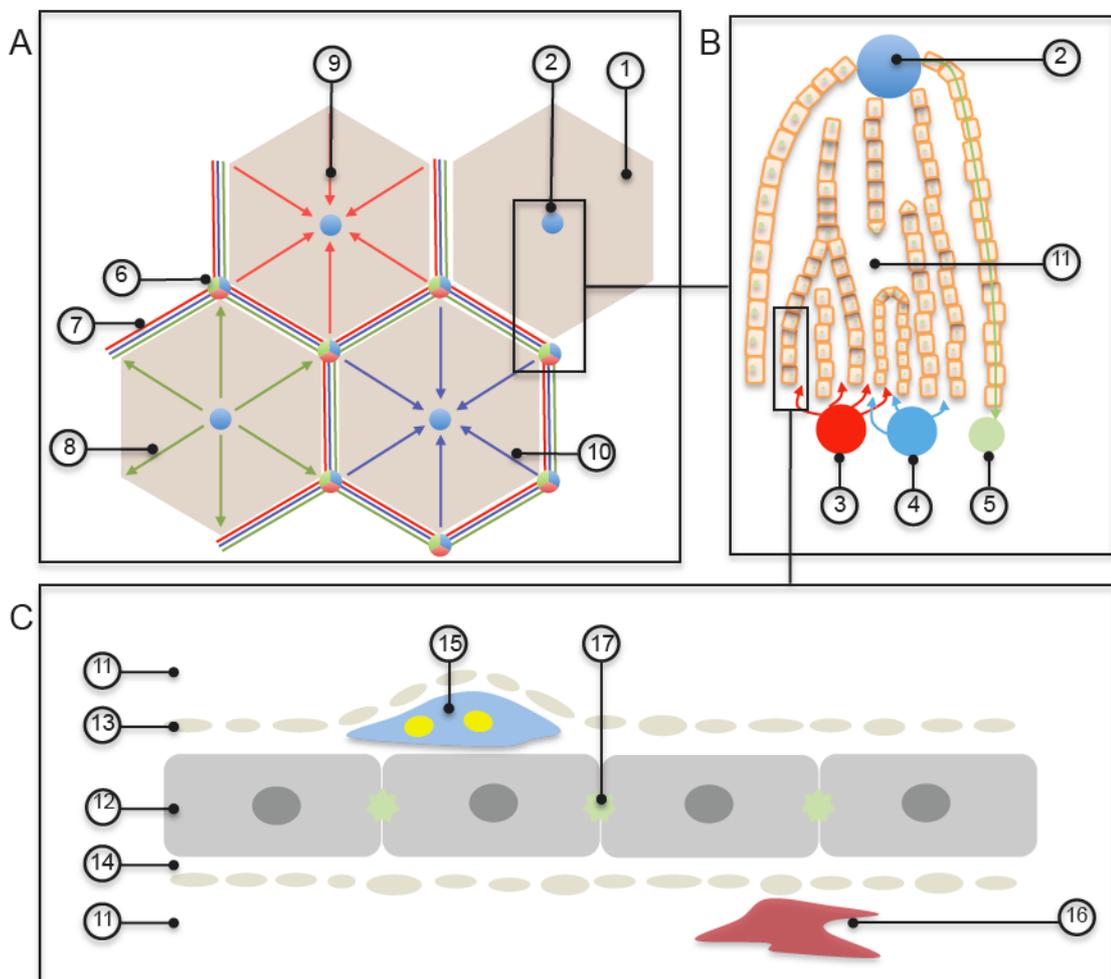


Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des Leberparenchyms

- (A) und (B) Darstellung der Leberläppchen (1) mit der mittig gelegenen Zentralvene (2). Die Endäste von Arteria hepatica (3), Vena portae (4) sowie interlobulären Gallengängen (5) bilden die Glisson'sche Trias (6) und verlaufen in den periportalen Feldern (7). Während der Gallenfluss (8) von der Zentralvene in die

1 Einleitung

Peripherie gerichtet ist, fließen arterielles (9) und venöses (10) Blut in den Sinusoiden (11) auf die Zentralvene zu

- (C) Anordnung der Hepatozyten (12) in den Sinusoiden (11). Zwischen sinusoidalem Endothel (13) und Hepatozyten befindet sich der Disse-Raum (14), in dem die Ito-Zellen (15) sitzen. Lumenseits der Endothelzellen finden sich die Kupffer-Zellen (16). Zwischen den Hepatozyten laufen die Gallenkanäle (17)

1.2.3 Endogene Leberregeneration

Die Leber hat eine im Organismus einzigartige Fähigkeit zur Regeneration, da die Hepatozyten im Vergleich zu anderen Zellen die Fähigkeit zur Proliferation und Repopulation geschädigten Leberparenchyms besitzen. In der adulten, gesunden Leber befinden sich die Hepatozyten größtenteils in der Ruhephase (G_0 -Phase) und weisen lediglich einen geringen *turnover* auf. Im Falle einer Leberschädigung, wie beispielsweise einer partiellen Hepatektomie, werden die Hepatozyten über die Interaktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen stimuliert. Dies ist ein multimodaler Prozess, der zwei Hauptschritte enthält. Zuerst erfolgt das sogenannte *Priming*, in dem die Hepatozyten für Wachstumsstimuli sensibilisiert werden. Hauptverantwortlich sind $TNF-\alpha$ und $IL-6$. Als nächster Hauptschritt folgt die Überführung in die G_1 -Phase, getriggert durch HGF, $TGF-\alpha$ und EGF (Fausto & Campbell, 2003). Das Ende der Proliferation wird hauptsächlich durch $TGF-\beta$ determiniert. Dabei ist das Verhältnis von Körpergewicht zu Lebermasse wichtiger als das Lebervolumen alleine (Fausto, 2004). Über diese Regulationsmechanismen kommt es bei Nagern infolge einer 2/3-Hepatektomie innerhalb von 7-10 Tagen volumenseitig zu einer vollständigen *restitutio ad integrem* des Leberparenchyms (Michalopoulos, 2007). Wird die Replikationsfähigkeit der Hepatozyten, wie beispielsweise im akuten Leberversagen, überschritten kommt es zusätzlich zur Aktivierung der „resident liver progenitor cells“ (Best et al., 2013). Diese Zellpopulation ist in den Hering-Kanälen oder in direktem Kontakt dazu lokalisiert und wurde erstmals 1956 von Farber et al. als *oval cells* bei Mäusen beschrieben (Farber, 1956). Auf Grund signifikanter anatomischer Unterschiede wird die Population im humanen System als *liver progenitor cells* und im murinen System als *oval cells* bezeichnet (Roskams et al., 2004). *Liver progenitor cells* oder *oval cells* sind bipotente Vorläuferzellen und können sich sowohl zu Hepatozyten als auch Cholangiozyten differenzieren (Newsome, Hussain, & Theise, 2004). Dabei durchlaufen die Zellen die vier Phasen Aktivierung, Proliferation, Migration und Differenzierung (Duncan, Dorrell, & Grompe, 2009). Inwiefern die Vorläuferzellen

1 Einleitung

einen entscheidenden Beitrag für die Regeneration leisten ist weiterhin zu diskutieren. Die Erkenntnis, dass die Anzahl der nachweisbaren *liver progenitor cells* oder *oval cells* mit dem Ausmaß der Leberschädigung steigt unterstreicht ihre mögliche Rolle in der Leberregeneration (Than & Newsome, 2014).

1.3 Stammzellen

Stammzellen beherbergen sowohl das Potential sich selbst zu erneuern (*self-renewal*) als auch zu gewebespezifischen Zellen zu differenzieren. Bei diesem, als asymmetrische Zellteilung beschriebenen, Phänomen entstehen aus der mitotischen Zellteilung einer Stammzelle eine weitere, klonale Stammzelle und eine Progenitor- oder Vorläuferzelle und ist ein stammzellspezifisches Teilungsmuster. Die Progenitorzellen sind dabei der erste Schritt in Richtung einer vollständig differenzierten Zelle (s. Abbildung 2). Die Einteilung der Stammzellen gelingt anhand des ontogenetischen Alters sowie des Differenzierungspotentials. Stammzellen, die das Potential haben zu allen Geweben zu differenzieren werden als totipotent bezeichnet und finden sich lediglich bei der befruchteten Eizelle bis zum Achtzellstadium. Mit dem Erreichen des Blastozystenstadiums werden die Stammzellen als pluripotent oder als embryonale Stammzellen bezeichnet. In diesem Stadium beherbergen sie das Potential sich zu primitiven Keimstammzellen und somatischen Stamm- und Progenitorzellen zu entwickeln. Embryonale Stammzellen können sich somit zu jedem Zelltyp des Organismus differenzieren sind jedoch nicht mehr in der Lage einen gesamten Organismus zu bilden. Postnatal wird dieses Stadium als adulte Stammzelle bezeichnet. Hierbei sind die Zellen in hämatopoetische, mesenchymale und endotheliale Stammzellen einzuteilen.

1.3.1 Hämatopoetische Stammzellen

Die reifen peripheren Zellen im Blut haben eine eingeschränkte Lebensdauer und sind mit Ausnahme der Lymphozyten nicht in der Lage sich durch Zellteilung zu vermehren. Sie alle haben ihren gemeinsamen Ursprung in einer kleinen Anzahl pluripotenter Zellen, den sogenannten hämatopoetischen Stammzellen. Der Ort der Hämatopoese ist beim gesunden, adulten Menschen vorwiegend das rote Mark der flachen Knochen, beim Feten die Leber und die Milz sowie im juvenilen Alter anteilig der Thymus. Da die Leber ihre Fähigkeit zur Hämatopoese komplett verliert und Milz und Thymus für

1 Einleitung

die Ausreifung der Lymphozyten verantwortlich sind, finden sich hämatopoetische Stammzellen beim Erwachsenen ausschließlich im Knochenmark. An der Spitze der hämatopoetische Zellhierarchie steht die multipotente Stammzelle (s. Abbildung 2). Innerhalb dieser Population kann noch einmal zwischen Langzeit- und Kurzzeit-Stammzellen sowie multipotenten Progenitorzellen unterschieden werden. Langzeit-Stammzellen verharren in der G_0 -Phase, während Kurzzeit-Stammzellen in die Differenzierung übergehen und sich zu multipotenten Progenitorzellen entwickeln. Dabei verlieren sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Aus diesen Vorläuferzellen können alle Zellreihen der myeloischen und lymphatischen Hämatopoese über Ausdifferenzierung in mehreren Entwicklungsstufen hervorgehen. Zunächst werden den multipotenten Vorläuferzellen die oligopotenten myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen untergeordnet, die auch als koloniebildende Einheiten (CFU) bezeichnet werden. Über weitere Vorstufen erfolgt im Blut und Gewebe aus diesen Einheiten die Ausreifung zu Erythrozyten, Thrombozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie den B-, T- und NK-Zellen des lymphatischen Systems.

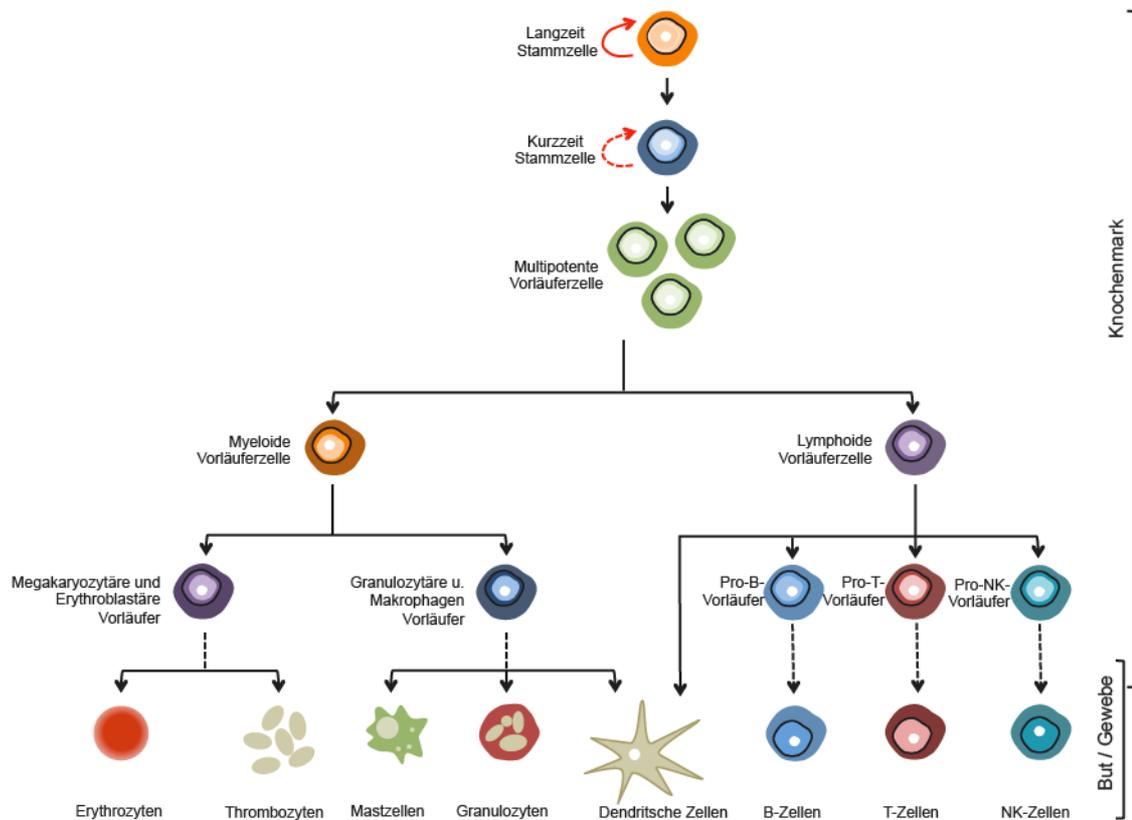


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Hämatopoese

1 Einleitung

Da Stamm- und Vorläuferzellen eindeutige morphologische Charakteristika fehlen werden sie anhand verschiedener Zelloberflächenmoleküle eingeteilt. Diese sind nach funktionellen oder biochemischen Kriterien geordnet und in dem Cluster of Differentiation aufgeführt. Im humanen Organismus sind aktuell über 300 verschiedene Zelloberflächenmoleküle bekannt.

In dieser Arbeit werden hämatopoetische Stammzellen untersucht, die durch folgende Oberflächenmarker charakterisiert:

- **CD-34**

CD-34 gehört zu den membranständigen Glykoproteinen vom Typ I mit einem Gewicht von circa 105kDa und wurde erstmals 1981 auf der Zelloberfläche humaner hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesen (Civin, Mirro, & Banquerigo, 1981). Dabei ist die Expression des Oberflächenmoleküls abhängig vom Grad der Differenzierung. Während die sehr unreifen, multipotenten Stammzellen keine oder eine nur schwache Merkmalsexprimierung aufweisen, sind die reiferen Stamm- und Vorläuferzellen stark positiv für dieses Merkmal (Krause et al., 1994). Mit der weiteren Differenzierung der Stammzellen hin zu den ausgereiften Zellen sinkt die Expression wieder ab, so dass in den reifen hämatopoetischen Zellen keine CD-34 Expression nachzuweisen ist. Auch wenn manche Autoren dem CD-34 Antigen eine Rolle für Zelladhäsion und -migration bei gleichzeitiger Inhibierung der hämatopoetischen Differenzierung zusprechen (Lange, Li, Fang, Baum, & Fehse, 2007), ist die genaue Funktion weiterhin unbekannt.

- **CD-45**

Das CD-45 Antigen wurde anfangs auch als *leucocyte common antigen* bezeichnet und wird von allen kernhaltigen Zellen der hämatopoetischen Reihe exprimiert. Somit sind alle humanen Leukozyten sowie die unreifen Vorstufen der Erythrozyten und Thrombozyten positiv für dieses Merkmal (Holmes, 2006). CD-45 stellt eine membranständige Protein-Tyrosinphosphatase dar. Ihr Substrat besteht aus zytosolischen Kinasen der Src-Familie, die zur Aktivierung der Signaltransduktion von T- und B-Zellrezeptoren beitragen. Über die Aktivierung der Src- sowie Janus-Kinasen greift die Phosphatase regulatorisch in die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen ein (Irie-Sasaki et al., 2001).

- **CD-133**

CD-133 ist ein Membranprotein mit 5 transmembranären Domänen und einem Gewicht von 120kDa (Miraglia et al., 1997). Es wurde erstmals 1997 auf einer Teilpopulation CD-34 positiver hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen des humanen Knochenmarks entdeckt (Yin et al., 1997) und wird im murinen System als Prominin-1 bezeichnet (Snippert et al., 2009). Initial wurde davon ausgegangen, dass das CD-133 Antigen ausschließlich auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert wird. Mittlerweile wurde dieses Antigen jedoch auch auf Zellen der Niere (Bussolati et al., 2005), auf neuronalen Stammzellen (Uchida et al., 2000), an humanen Hämangioblasten (Loges et al., 2004) sowie in der fetalen Leber (Schmelzer et al., 2007) nachgewiesen. Weitere Untersuchungen zeigten darüber hinaus eine Expression des CD-133 Oberflächenmoleküls auf endothelialen Progenitorzellen (Gehling et al., 2000; Peichev et al., 2000). Auch eine Reihe von Krebszellen exprimieren CD-133, so dass das Antigen auch als Krebsmarker diskutiert wurde (Mizrak, Brittan, & Alison, 2008). Da aber sowohl maligne als auch benigne Zellen positiv für CD-133 sind, scheint die alleinige Expressierung nicht ausreichend für eine Charakterisierung hinsichtlich der Dignität zu sein (Shmelkov et al., 2008). Analog zum CD-34 ist die Funktion des CD-133 Oberflächenmarkers bis dato ungeklärt.

1.3.2 Leberregeneration mittels Knochenmarkstammzellen

In den letzten Jahren reifte die Erkenntnis, dass die im Knochenmark lokalisierten hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen eine heterogenere Population bilden als bisher angenommen. Mehrere Studien zeigten, dass diese Zellen neben der Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Systems zusätzlich das Potential beherbergen sich zu Zellen außerhalb der hämatopoetischen Zelllinie zu differenzieren (Krause et al., 2001). Neben Berichten über die Differenzierung zu Muskel- (Dell'Agnola et al., 2002; Jackson, Mi, & Goodell, 1999), Herzmuskel- (Orlic et al., 2001) und Gliazellen (Eglitis & Mezey, 1997) stand vor allem die Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen bei der Leberregeneration im Fokus.

Da pränatal die Leber an der Hämatopoese beteiligt ist, wurde vermutet, dass auch adulte hämatopoetische Stammzellen in der Lage sind sich zu Hepatozyten und

1 Einleitung

Cholangiozyten zu differenzieren. So wurden Y-Chromosomen in den Hepatozyten von Frauen nachgewiesen, die eine Knochenmarkspende von gegengeschlechtlichen Spendern erhalten hatten (Alison et al., 2000; Theise et al., 2000). Lagasse et al. wiesen im Tierexperiment nach, dass sich ausschließlich hämatopoetische Knochenmarkstammzellen in der Leber angesiedelt haben und zusätzlich noch einen proliferativen Effekt auf die Hepatozyten ausüben (Lagasse et al., 2000). Auf Basis dieser Erkenntnisse beobachteten de Silvestro et al. eine deutlich erhöhte Mobilisierung von CD 34⁺ hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen (CD 34⁺ KMSZ) nach Leberresektionen (De Silvestro et al., 2004). Auch im murinen Tierexperiment wurde die direkte Beteiligung von CD 34⁺ KMSZ (Fujii et al., 2002) an der Leberregeneration nachgewiesen. Gehling et al. veröffentlichten im Jahr 2005 ihre Beobachtungen, dass bei gesunden Leberteilspendern eine signifikant erhöhte Mobilisierung von CD133⁺ KMSZ zu finden ist (Gehling et al., 2005). Auch die CD39⁺ Subpopulation der CD133⁺ KMSZ zeigt eine deutlich erhöhte Mobilisierung nach Leberteilresektionen sowohl bei Mensch als auch Maus (Schmelzle et al., 2013). Bei anderen großen abdominell chirurgischen Eingriffen war diese Mobilisierung nicht zu beobachten. Schulte am Esch et al. zeigten, dass mittels portaler Applikation von autologen CD133⁺ KMSZ die Wachstumsrate der Leber, bei funktioneller Vergleichbarkeit mit langsamer proliferierendem Gewebe, signifikant gesteigert werden kann (J. S. am Esch et al., 2012).

Durch die Erkenntnis, dass Knochenmarkstammzellen an der Leberregeneration beteiligt sein könnten, rückte die Frage der Mechanismen in den Fokus. Dabei etablierten sich unterschiedliche Hypothesen:

- (A) Der alleinige Kontakt von hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen und Hepatozyten ist ein ausreichender Stimulus für die hämatopoetischen Stammzellen sich zu Hepatozyten oder *hepatocyte like cells* (Yu et al., 2012) zu differenzieren (Almeida-Porada, Porada, Chamberlain, Torabi, & Zanjani, 2004; Jang, Collector, Baylin, Diehl, & Sharkis, 2004; Newsome et al., 2003).
- (B) Der Differenzierung geht eine Zell-Zell-Fusion von Hepatozyten und hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen voraus, die zu einer vermehrten Zellteilung der fusionierten Zelle führt (Grompe, 2003; Terada et al., 2002; Vassilopoulos, Wang, & Russell, 2003).

1 Einleitung

(C) Die von dieser Arbeitsgruppe favorisierte Hypothese, ist die der Orchestrierung lokaler Regenerationsmechanismen in der Leber durch sich ansiedelnde, extrahepatische Stammzellen über Zell-Zell-Kontakte und homerales *Signaling*. Auch die Modifikation inflammatorischer Reaktionen der regenerierenden Leber könnte hier eine Rolle spielen (Schmelzle et al., 2013).

1.3.3 Mobilisierung der Knochenmarkstammzellen zur Leber

Eine wichtige Voraussetzung für die Rolle der Stammzellen bei der Leberregeneration ist die periphere Mobilisierung der Stammzellen und Anlockung hin zum geschädigten Gewebe. Die Anzahl der mobilisierten Knochenmarkstammzellen in der frühen postoperativen Phase korreliert positiv mit dem Wachstums- und Regenerationspotential der Leber (Lehwald et al., 2014). Auch wenn der genaue Mechanismus der Mobilisierung auf molekularer Ebene weiterhin ungeklärt ist, zeigen bestimmte Zytokine und Wachstumsfaktoren nach großen Leberresektionen postoperativ erhöhte Serumwerte. Dieses Phänomen wurde dabei für den *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) (Aiuti, Webb, Bleul, Springer, & Gutierrez-Ramos, 1997; Kollet et al., 2003), den *stem cell factor* (SCF) (Krieg et al., 2006) sowie den *hepatocyte growth factor* (HGF) (Tajima et al., 2010) nachgewiesen. HGF und SDF-1 mobilisieren dabei spezifisch CD133⁺ und CD 45⁺ hämatopoetische Stammzellen (Lehwald et al., 2014). Das Maß der Freisetzung von SCF korreliert mit dem Ausmaß der Resektionsgröße (Krieg et al., 2006). Diese Daten unterstützen die Theorie des positiven Effekts der hämatopoetischen Knochenmarkstammzellen auf die Regenerationsfähigkeit der Leber.

1.3.4 Interaktion von Knochenmarkstammzellen und Endothel

Die Interaktionen von Stammzellen und Endothelzellen wurden nahezu ausschließlich am Endothel des Knochenmarks untersucht, da dies für die weit verbreitete Stammzelltransplantation im Rahmen von hämatologisch-onkologischen Erkrankungen von großem Interesse ist. So wurde gezeigt, dass CD34⁺ Vorläufer Zellen überhaupt am Knochenmarkendothel anheften und transmigrieren können (Mohle, Moore, Nachman, & Rafii, 1997). Weitere Untersuchungen am Nabelschnur- und Knochenmarkendothel zeigen, dass SDF-1 nicht nur die periphere Mobilisation von Stammzellen fördert, sondern auch direkt die transendotheliale Migration von CD34⁺ Stammzellen induziert (Voermans, Rood, Hordijk, Gerritsen, & van der Schoot, 2000). Als mögliche

1 Einleitung

vermittelnde Co-Faktoren werden β_1 -Integrin, β_2 -Integrin (Hwang et al., 2006) und PECAM-1 diskutiert (Yong et al., 1998). Neben den Untersuchungen bezüglich der Transmigration von $CD34^+$ Stammzellen wurde auch nach möglichen Adhäsionsmolekülen für $CD133^+$ Zellen gesucht. Rastogi et al. zeigten dabei, dass $CD133^+$ Zellen neben PECAM-1 auch den *Platelet activating factor receptor* (PTAFR) exprimieren (Rastogi, White, Rickard, & McHowat, 2008).

Die mögliche Beteiligung von PECAM und PTAFR an der Adhäsion von Stammzellen am Endothel legen die Vermutung nahe, dass Thrombozyten eine zentrale Rolle in diesem Vorgang spielen könnten. Die Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Interaktion von $CD133^+$ Stammzellen und Endothel, insbesondere des sinusoidalen Endothels, sowie der Rolle der Thrombozyten sind dennoch weiterhin sehr gering.

1.4 Thrombozyten

Thrombozyten oder Blutplättchen spielen eine zentrale Rolle bei Hämostase, Thrombose, Wundheilung aber auch bei Tumormetastasierung und Entzündungen.

Sie sind unter anderem charakterisiert durch die Oberflächenrezeptoren CD31 und CD62p. CD31 ist auch als PECAM bekannt und ein membranständiges Glykoprotein mit einem Gewicht von 120-130 kDa. Es ist sowohl auf Thrombozyten als auch gefäßständigen Endothelzellen zu finden (Albelda, Muller, Buck, & Newman, 1991). PECAM induziert eine verminderte Aggregation von Thrombozyten, wie Untersuchungen an PECAM-defizienten Mäusen zeigten (Falati et al., 2006).

CD62p oder P-Selektin ist ein 120 kDa Membranprotein welches in den α -Granula der Thrombozyten (Stenberg, McEver, Shuman, Jacques, & Bainton, 1985) sowie den Weibel-Palade Körperchen unstimulierter Endothelzellen (Bonfanti, Furie, Furie, & Wagner, 1989) gespeichert ist. Eine Stimulierung der Thrombozyten führt zu einer Expression des Rezeptors auf der Zelloberfläche (Weyrich et al., 1996). Dort vermittelt P-Selektin das Anbinden und Rollen von Thrombozyten an der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen (Frenette, Johnson, Hynes, & Wagner, 1995; Khandoga et al., 2002). Als Ligand für P-Selektin fungiert der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1).

Thrombozyten entstehen als Teil des hämatopoetischen Systems durch Abschnürung aus ihren Vorläuferzellen, den im Knochenmark lokalisierten Megakaryozyten (s. Abbildung 2) und weisen eine diskoide Form auf. Während der Ausreifung verlieren die

1 Einleitung

Thrombozyten ihren Zellkern und somit die Fähigkeit der Proteinsynthese. Die normale Thrombozytenzahl beträgt beim Menschen zwischen $1,7 - 4 \times 10^5/\mu\text{l}$ Blut bei einem Volumen von 7,5 - 10 fl. Diese Zahlen weichen von denen der Maus deutlich ab. So beträgt die Thrombozytenzahl hier mit circa $1,1 \times 10^6/\mu\text{l}$ in etwa das 10-fache, während das Volumen von 4,7 fl ungefähr der Hälfte entspricht (Peters et al., 2002). Trotz der morphologischen Unterschiede sind murine und humane Thrombozyten hinsichtlich ihrer Funktionalität so ähnlich, dass diesbezügliche Aussagen für beide Populationen gleich getroffen werden können (Schmitt, Guichard, Masse, Debili, & Cramer, 2001).

Der Aufbau des Thrombozyten lässt sich morphologisch in vier Zonen einteilen.

In der peripheren Zone befindet sich die trilaminäre Zellmembran, bestehend aus äußerer Glykokalix, den Glykoproteinen sowie Mukopolysacchariden.

Die strukturelle Zone wird vom Zytoplasma gebildet und setzt sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und submembranös gelagerten Filamenten zusammen. Sie ist für die diskoide Form der ruhenden Thrombozyten verantwortlich. Bei der Thrombozytenaktivierung ermöglicht dieses System die Ausbildung von Pseudopodien und die Formveränderung der Thrombozyten (*Shape change*) sowie die Degranulation.

Die Zone der Organellen bilden Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei verschiedene Arten von Speichergranula, die als Dichtegranula, α -Granula und Lysosomen bezeichnet werden. Die Dichtegranula hat vor allem Einfluss auf die Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation. Sie enthält Adenosintriphosphat (ATP), Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin, Calcium, Phosphat, Histamin und Guaninnukleotide. Die α -Granula stellt quantitativ den größten Anteil an der Granula und enthält Proteine verschiedener Funktionen wie z.B. den von-Willebrand Faktor, P-Selektin, *platelet-derived growth factor* (PDGF), *platelet factor 4*. Die lysosomale Granula enthält die für sie typischen hydrolytischen Enzyme. Bei der Aktivierung verschmelzen die Granula mit der Membran und können die gespeicherten Substanzen freisetzen.

Das Membransystem setzt sich aus einem offenen kanalikulären und dichtem tubulären System zusammen. Das kanalikuläre System reicht bis weit in das Zellinnere und bewirkt eine stark vergrößerte Zelloberfläche, die dem Substanz Austausch zwischen Extra- und Intrazellulärraum dient. Das tubuläre System fungiert als Kalzium Speicher und spielt eine zentrale Rolle bei der Plättchenaktivierung.

1 Einleitung

1.4.1 Aktivierung von Thrombozyten

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt durch verschiedene physiologische Stimuli mit nachgeschaltetem *second-Messenger* System. Dabei wird zwischen membranständigen Proteinen und löslichen Agonisten unterschieden.

Als Folge einer Schädigung von Endothelzellen und der damit verbundenen Freilegung der subendothelialen Matrix kommt es zum Kontakt der Thrombozyten mit den dort lokalisierten prothrombotischen Proteinen. Vor allem der von-Willebrand-Faktor (vWF) und das Kollagen spielen dabei eine zentrale Rolle (Savage, Almus-Jacobs, & Ruggeri, 1998). Quelle der löslichen Agonisten kann sowohl die Freisetzung aus der beschädigten Endothelzelle als auch die Freisetzung aus bereits aktivierten Thrombozyten sein. Als lösliche Agonisten fungieren unter anderem Thrombin, Thromboxan A₂ und ADP.

Diese Aktivatoren interagieren mit den auf der zytoplasmatischen Seite lokalisierten G-Proteinen der Thrombozyten, deren Stimulierung eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu Folge hat und eine Kettenreaktion in Gang setzt. Die Stärke des Aktivierungsreizes korreliert dabei mit der intrazellulären Kalziumkonzentration. Zu Beginn kommt es zu einer Veränderung der morphologischen Struktur, bei der durch Umlagerung von Aktinfilamenten sogenannte Pseudopodien entstehen. Dieser Vorgang hat eine Vergrößerung der Oberfläche (*Shape Change*) sowie eine Aggregationsreaktion zur Folge und ist potentiell reversibel. Bei stärkster Aktivierung kommt es zur irreversiblen Aggregation und Freisetzung der gespeicherten Granula in der Reihenfolge: Dichtegranula → α -Granula → Lysosomen. Dieser Vorgang wird als Sekretion oder Degranulation bezeichnet und hat die hohe lokale Konzentration der freigesetzten Substanzen aus der Granula zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit werden die Thrombozyten mittels ADP voraktiviert. ADP ist ein vergleichsweise schwacher Aktivator (Holmsen, 1994), der an zwei G-Protein gekoppelte Rezeptoren, den P₂Y₁- und P₂Y₁₂-Rezeptor bindet. Die Bindung an den P₂Y₁-Rezeptor hat eine intrazelluläre Kalzium-Mobilisation sowie eine reversible Formveränderung und Aggregation zur Folge. Die Aktivierung des P₂Y₁₂-Rezeptor zieht die Sekretion von Granula sowie eine stabilere Aggregation nach sich (Storey, Newby, & Heptinstall, 2001).

1 Einleitung

1.4.2 Die Rolle der Thrombozyten für die Leberregeneration

Unter Bedingung des direkten Zell-Zell-Kontakts ist den Thrombozyten ein proliferierender Effekt in Abhängigkeit verschiedener Wachstumsfaktoren wie IGF-1, HGF und VEGF auf Hepatozyten in vitro nachgewiesen (Matsuo et al., 2008). Des Weiteren wurde in der Frühphase der Leberregeneration sowohl bei Nagern (Murata et al., 2007) als auch beim Menschen (Starlinger et al., 2015) eine deutliche Akkumulation von Thrombozyten in der Leber nachgewiesen. Den Thrombozyten wird dabei unter anderem eine protektive Wirkung in der Frühphase der Leberschädigung zugeschrieben (Lopez et al., 2014). Dabei scheinen die von den Thrombozyten sezernierten Faktoren eine elementare Rolle zu spielen. So konnte eine verminderte Regenerationsfähigkeit der Leber in thrombozytopenischen Mäusen mittels Serotonin-Agonisten wieder gesteigert werden (Lesurtel et al., 2006). Auch die aus der α - Granula sezernierten Mediatoren scheinen einen positiven Einfluss auf die Leberregeneration zu haben (Starlinger et al., 2015).

1.5 Interaktion von Stammzellen und Thrombozyten

Die Interaktionen von Stammzellen und Thrombozyten wurden bis dato nahezu ausschließlich unter dem Gesichtspunkt von Endothelverletzungen oder Entzündungsprozessen, nicht aber hinsichtlich der Leberregeneration untersucht. Durch die Aktivierung adhärenter Thrombozyten am beschädigten Endothel kommt es unter anderem zur Ausschüttung von SDF-1. Wie bereits beschrieben fördert SDF-1 sowohl die Mobilisierung, als auch die Adhäsion von $CD34^+$ Stammzellen (Stellos & Gawaz, 2007b). Die Thrombozytenadhäsion am dysfunktionalen Endothel ist dabei ein elementarer Schritt für die spätere Adhäsion der Stammzellen, da diesen die direkte Anheftung an subendotheliale Matrixproteine bei hohen Shear-Kräften der Gefäße schwer fällt (Stellos, Gnerlich, Kraemer, Lindemann, & Gawaz, 2008).

Die Beobachtung, dass weiße Thrombi die Bindungsfähigkeit von $CD34^+$ an einen endothelialen Monolayer erhöht, legt den Schluss nahe, dass darüber hinaus auch die klassischen Thrombozyten Adhäsion-Mediatoren, wie z.B. P-Selektin eine Rolle für die Adhäsion der hämatopoetischen Stammzellen am Endothel spielen könnten (de Boer et al., 2006). Liu et al. entdeckten eine erhöhte Effektivität bei der Stammzelltransplantation im Rahmen kindlicher akuter Leukämien, wenn $CD34^+$ Stammzellen mit *platelet-derived microparticels* (PMP) vorinkubiert werden (Liu et al.,

1 Einleitung

2003). Diese Entdeckung wird von anderen Autoren bestätigt, die den PMP ebenfalls eine wichtige Rolle für Modulierung der Differenzierung hämatopoetischer Zellen über Zell-Zell-Kommunikation zuschreiben (Baj-Krzyworzeka et al., 2002). Dies lässt sich dadurch erklären, dass CD34⁺ Stammzellen Thrombozyten-typische Antigene wie CD41, CD61 und PAR-1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und so mit und über PMP (Janowska-Wieczorek et al., 2001) interagieren können.

Auf Basis dieser Informationen wurde die Hypothese formuliert, dass Thrombozyten eine zentrale Rolle in Rahmen der Leberregeneration durch hämatopoetische Stammzellen spielen.

2 Ziele der Arbeit

Klinische Erfahrungen und experimentelle Daten unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass die Applikation von CD-133⁺ Knochenmarkstammzellen einen positiven Einfluss auf die Leberregeneration vor einer erweiterten Resektion der Leber hat. Eine wesentliche Rolle spielt dabei das *Homing* der CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen entlang des Endothels. Frühere Arbeiten lassen vermuten, dass die Thrombozyten an der Adhäsion der Stammzellen an das Endothel beteiligt sein könnten. Das frühe Schicksal und die Mechanismen des *Homings* von CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen entlang des (sinusoidalen) Endothels sind wenig untersucht. Um genauere Einblicke in diese Prozesse und den daraus resultierenden therapeutischen Möglichkeiten zu erhalten, sind folgende Ziele für die vorliegende Arbeit definiert:

1. Transfer des etablierten humanen Co-Kulturmodells von dermalen Endothelzellen und Knochenmarkstammzellen unter Flussbedingungen in ein murines Modell. Auf Grund der höheren Homogenität der Versuchsbedingungen gewährleistet das murine Modell eine bessere Vergleichbarkeit. Darüber hinaus stellt dieses Modell die Grundlage für den Einsatz von Knock-out Mäusen als Zellspender dar und somit auch für weitere, spezifischere Untersuchungen.
2. Verifizierung der Rolle von Thrombozyten beim *Homing* CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen Endothels.
3. Ersatz der murinen, dermalen Endothelzellen im Co-Kulturmodell mit Knochenmarkstammzellen unter Fluss durch murine hepatisch-sinusoidale Endothelzellen. Der Einsatz dieser Endothelzellen ermöglicht die Überprüfung der am dermalen Endothel getroffenen Aussagen in einem leberspezifischen System.

3 Material

3 Material

3.1 Verwendeten Geräte

Gerät	Typ	Firma
Aggregometer	Lumi-Aggregometer	Chrono-Log-Corporation
Bench	Biological Safety Cabinet	Microflow
BGA-Gerät		
Bioflux	Bioflux 200	Fluxion
Sorter	MoFlo XDP	Beckman-Coulter
Inkubator	Forma Steri-Cult	Thermo Scientific
Mikroskop	MPS 32	Leica
Pipette	Constant Rate Syringe	Chrono-Log-Corporation
Stickstofftank	Biosafe MD	Cryotherm
Wasserbad	Thermostatic Water-Bath	NeoLab
Zentrifuge	Multifuge X1	Thermo Scientific

3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Firma	Bestellnummer
Biofluxplatten	Fluxion	910-0048
FACS Rörchen	BD Falcon Bioscience	352-340
Falkon, versch. Größen	Cellstar	227-261 188-271
Filter, 70 µm	BD Flacon Bioscience	352-052
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One	628-160
Glasrohr Aggregometer	Chrono-Log-Corporation	367
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One	121-263
laminiertes Rührfisch	Chrono-Log-Corporation	370
Nadel, 20 G	Braun	465-7519
Nadel, 26 G	Braun	466-5457
Pasteurpipette	ratiolab	260-011-1
Pipettenspitzen, 10µl – 10000µl	Starlab	S1121-3810 S1120-1740 S1126-7710
Präparierbesteck	Aesculap, Braun	

3 Material

Verbrauchsmaterial	Firma	Bestellnummer
Skalpell	Feather	02-011-30-011
Spritze, 1 ml	Braun	916-140-6V
Zellkulturflasche, 25 und 75 cm ²	Greiner-Bio-One	690-160 658-170

3.3 Chemikalien

Chemikalien	Firma	Bestellnummer
ADP	Sigma	72696-48-1
Aqua bidest.	Gibco	15230-147
DMSO	Sigma	2206-27-1
DPBS	Gibco	14190-094
Fibronektin	BD Bioscience	354-008
Gelatine	Cellbiologics	1308
Heparin 25000 I.E./5ml	Ratiopharm	
Histopaque-1083	Sigma-Aldrich	RNBD-3315
KF38789	Tocris Bioscience	257-292-29-8
Red Blood Cell Lysis	Miltenyi Biotec	130-094-183
RPMI 1640	Gibco	61870-010
Trypanblau	Gibco	15250-061
Trypsin-EDTA, 0,05%	Gibco	25300-054
Trypsin-EDTA, 0,25%	Gibco	25200-056

Alle Chemikalien wurden entsprechend der Herstellerempfehlungen gelagert und verwendet. Nicht steril verpackte Chemikalien wurden vor der Verwendung steril filtriert.

3.4 Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Firma	Bestellnummer
Anti-mouse CD34 eFluor 660	eBioscience	50-0341-80
Anti-Prominin-1-PE	Miltenyi Biotec	130-092-334

3 Material

Anti-CD 45 FITC	Miltenyi Biotec	130-091-609
-----------------	-----------------	-------------

3.5 Zelllinien

Zelllinie	Firma	Bestellnummer
C57BL/6 Mouse Primary Dermal Endothelial Cells	PeloBiotech	PB-C57-6064
C57BL/6 Mouse Primary Liver Sinusoidal Endothelial Cells	PeloBiotech	PB-C57-6017

3.6 Zellkulturmedien

Kulturmedium	Firma	Bestellnummer
Einfriermedium	PeloBiotech	PB-M1168 + 10% DMSO + 10% FCS
Endothelial Cell Medium Kit	PeloBiotech	PB-M-1168

3.7 Software

Programm
Bioflux-Software
Microsoft Excel 2011 for Mac
Graphpad Prism 6 for Mac

3.8 Versuchstiere

Als Spender für Thrombozyten und Knochenmarkstammzellen dienen männliche C57BL/6 Mäuse. Die Tiere werden über die Tierversuchsanstalt der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bezogen und dort am Versuchstag abgeholt. Für die artgerechte Haltung bis zum Versuchstag sorgt die Tierversuchsanstalt. Die Tiere haben ein Alter von 4-6 Wochen und ein Gewicht von 25-30g.

4 Methoden

3.8.1 Genehmigung des Tierversuchprojekts

Die Genehmigung für die Organentnahmen erfolgte nach Anzeige des Tierversuchsvorhabens durch die Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität unter dem Aktenzeichen o80/12. Die Tiere werden per Herzpunktion und zervikaler Dislokation unter volatiler Isofluran-Narkose getötet und anschließend Blut und Knochenmark entnommen. Der erforderliche versuchstierkundliche Übungsschein gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes wurde vorab erworben.

4 Methoden

Die in der Arbeit verwendeten Methoden sind in drei Überthemen einzuteilen (s. Abbildung 3):

1. Tierexperimenteller Teil, der die Aufreinigung der murinen Thrombozyten und der Knochenmarkstammzellen (KMSZ) beinhaltet.
2. Zellkultur der dermalen und sinusoidalen Endothelzellen.
3. *Live Cell Imaging* im Bioflux 200 System zur Beobachtungen der Co-Kulturmodelle von Endothelzellen, Thrombozyten und KMSZ.

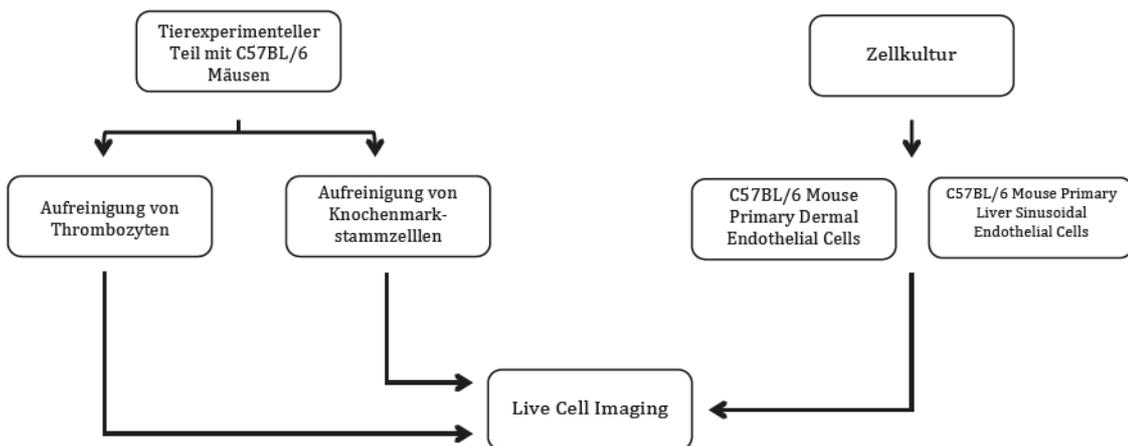


Abbildung 3: Übersicht Methodik

Den Zielen der Arbeit folgend werden vier verschiedene Versuchsanordnungen gewählt. Jede der Versuchsanordnungen wird an 5 Versuchspaaren durchgeführt (n=5). Eine Übersicht der Versuchsanordnungen in Abhängigkeit von der Zielsetzung der Arbeit und den dafür notwendigen Parametern gibt Tabelle 1.

4 Methoden

Ziele der Arbeit Parameter	Transfer des humanen in ein murines System	Verifizierung der Rolle der Thrombozyten für das Homing CD133+ KMSZ im murinen System			Übertragung des Modells auf leberspezifische Zellen
Endothelzellen des Monolayer	C57BL/6 Mouse Primary Dermal Endothelial Cells			C57BL/6 Mouse Primary Liver Sinusoidal Endothelial Cells	
Bedingungen der Co-Inkubation	Kontrollkanal	PPP	PPP	PRP	PPP
	Probekanal	PRP	mittels ADP voraktiviertes PRP	mittels KF 38289 blockiertes PRP	PRP
Verwendete KMSZ	CD 133 ⁺				

Tabelle 1: Übersicht der Versuche in Abhängigkeit von den Zielen der Arbeit

Für den Transfer eines etablierten humanen Systems in ein murines entlang des Endothels werden analog zu dem humanen Modell dermale murine Endothelzellen kultiviert und in die Flusskammer des *Live-Cell-Imaging* Systems eingebracht. Um den Einfluss von Thrombozyten auf die Adhäsion von CD 133⁺ KMSZ nachzuweisen, werden die Endothelzellen anschließend mit Thrombozyten-reichem Plasma (PRP) und Thrombozyten-armen Plasma (PPP) co-inkubiert. Bei der anschließenden Perfusion der Flusskammer mit CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen wird deren Adhäsion entlang des murinen Endothels beobachtet. Die Durchführung findet dabei in einem System für *Live-Cell-Imaging* statt, das die Analyse und Quantifizierung der Adhäsion der CD133⁺ KMSZ in Bezug auf Adhäsion entlang des Endothels ermöglicht.

Die Verifizierung der Beteiligung von Thrombozyten an der Adhäsion CD-133⁺ KMSZ entlang des Endothels gelingt mittels Co-Inkubation des Endothels mit Thrombozyten in verschiedenen Anregungszuständen. Zum Einen erfolgt die Aktivierung der Thrombozyten durch ADP, zum Anderen erfolgt eine Inkubation mit dem selektiven P-Selectin Inhibitor KF38789.

4 Methoden

Für die Entwicklung eines leberspezifischen Systems ist es notwendig die dermalen durch sinusoidale Endothelzellen zu ersetzen. Um die Funktionalität dieses Systems nachzuweisen werden auch hier die Endothelzellen mit PPP und PRP co-inkubiert und die Adhäsion von CD133⁺ KMSZ entlang des Endothels beobachtet.

4.1 Isolierung & Kultivierung muriner Zellen

In den Co-Kulturmodellen werden neben den Endothelzellen murine CD 133⁺ KMSZ sowie murine Thrombozyten oder Plasma eingesetzt. Für die Arbeit mit einem murinen System kann auf keine Erfahrungswerte zurückgegriffen werden, so dass die Methodik zur Aufreinigung muriner Thrombozyten und Knochenmarkstammzellen etabliert werden muss.

In den einzelnen Versuchen entstammen Stammzellen und Thrombozyten oder Plasma immer aus einer Maus, sodass die Aufreinigung der verschiedenen Zellarten parallel stattfindet.

Die Mäuse werden mittels Isofluran-Narkose narkotisiert und anschließend das Herz mittels 20G Nadel punktiert und zusätzlich eine zervikale Dislokation durchgeführt.

4.1.1 Aufreinigung der Blutproben zur Isolation der Thrombozyten

Die bei der Herzpunktion gewonnene Blutmenge beträgt 0,7 - 1ml. Für die Antikoagulation wird 0,1ml Heparin (150U/l) in der verwendeten Spritze vorgelegt. Die Endkonzentration in der Probe beträgt somit 15 Units Heparin / ml Blut.

4.1.1.1 Herstellung von murinem plättchenreichen (PRP) und plättchenarmen (PPP)

Plasma

Das abgenommene Blut wird bei 100 x g für 10min bei Raumtemperatur ungebremst zentrifugiert, um das Plasma von den Erythrozyten und Leukozyten zu trennen. Es entstehen zwei Phasen. Oben findet sich das Plasma zusammen mit den kleinen, leichten Thrombozyten während sich unten die schwereren Blutbestandteile wie Erythrozyten und Leukozyten absetzen. Das plättchenreiche Plasma wird als trüber Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen. Je nach Menge und Trennungsschärfe der Phasen wird das Blut anschließend invertiert, die Zentrifugation wiederholt und die abgenommen PRP - Proben vereint. Es sollte eine Thrombozytenkonzentration von 3×10^5 vorliegen.

4 Methoden

Zur Herstellung des plättchenarmen Plasmas wird die verbliebene Blutprobe bei 1000 x g für 10min erneut bei Raumtemperatur, jedoch gebremst, zentrifugiert. Das PPP wird als klarer Überstand mittels Pasteurpipette abgenommen.

4.1.1.2 Aktivierung des murinen PRP durch ADP

Für die Versuchsreihe mit aktiviertem PRP werden die murinen Thrombozyten mittels ADP voraktiviert und in einem Analysegerät turbidimetrisch gemessen. Die Plättchenaggregation wird hierbei anhand der Licht-Transmissionaggregometrie (LTA) nach Bohr am Lumi-Aggregometer der Firma Chronolog gemessen (s. Abbildung 4). Bei dieser 1963 entwickelten Methode wird das PRP in einer Küvette zwischen einer Lichtquelle und einer Fotozelle platziert. Durch die Verwendung eines laminierten Magnetrührkerns wird die Probe kontinuierlich gemischt. Nach Zugabe eines Thrombozyten-Agonisten, wie in unserem Falle ADP, aggregieren die Plättchen und absorbieren weniger Licht. Die einsetzende Aggregation führt zu einer Aufklärung des PRP und damit zu einer höheren Lichtdurchlässigkeit. Die Transmissionszunahme innerhalb einer gegebenen Zeit steht dabei in einem direkten Verhältnis zur Thrombozytenaggregation. Alle hier beschriebenen Schritte erfolgen bei einer Temperatur von 37°C.

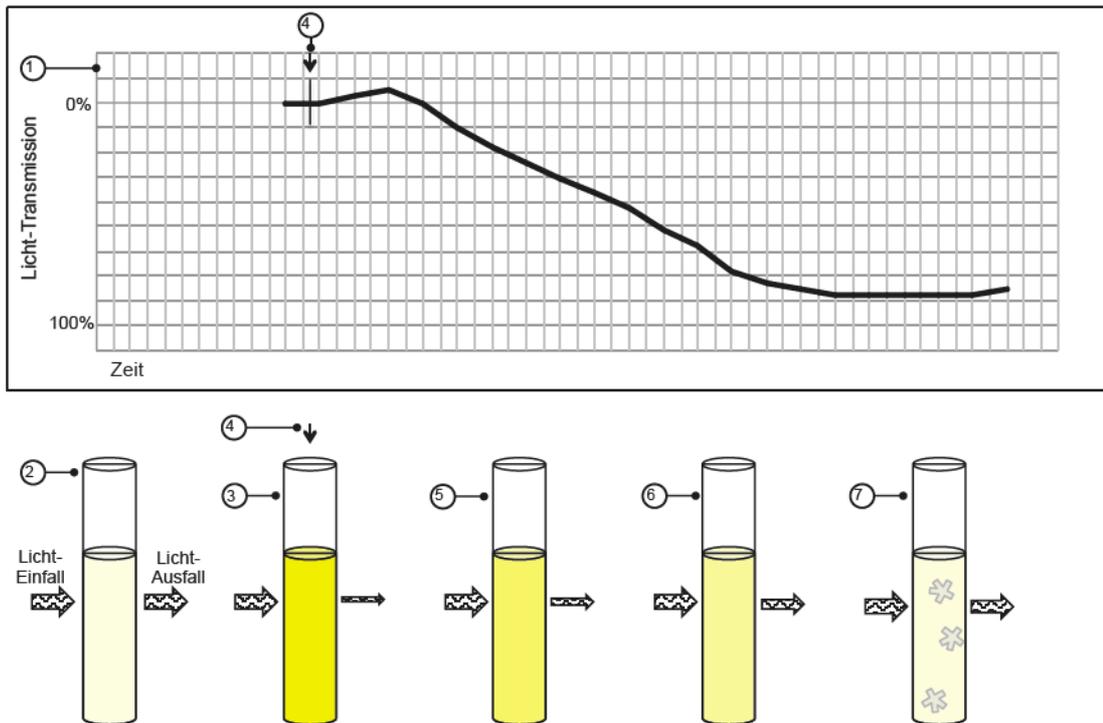


Abbildung 4: Prinzip der Licht-Transmissionsaggregometrie nach Bohr

Bei der Licht-Transmissionsaggregometrie wird die Lichtdurchlässigkeit gegen die Zeit gemessen (1). Dabei wird eine Probe PPP (2) als Referenz verwendet. Zu einer Probe PRP (3) wird ein Thrombozyten-Agonist gegeben (4), der zu einer Aggregation der Thrombozyten und einer Entfärbung der Proben führt (5-7).

4.1.2 Aufreinigung muriner CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen

Die Aufreinigung der Stammzellen besteht aus zwei Teilschritten. Im ersten Schritt werden die mononukleären Zellen aus den Knochen gespült, zu dessen Population auch die CD 133⁺ KMSZ gehören. Mittels Phasentrennung oder Erythrozytenlyse werden diese von weiteren Bestandteilen des Knochenmark-Aspirats getrennt. In dem zweiten Schritt wird mittels FACS-Analyse und *Cellsorting* eine ausschließlich aus CD 133⁺ Knochenmarkstammzellen bestehende Population isoliert.

4.1.2.1 Knochenmarksaspiration

Nach der zervikalen Dislokation beginnt die Präparation der Hinterläufe, bei der zu Beginn mit einer Schere das Fell über einem der Hinterläufe eingeschnitten und von hier nach distal abgezogen wird. Darauf folgt die Präparation und Exartikulation der Hüftgelenke, die Trennung der Extremität in Tibia/Fibula und Femur sowie die

4 Methoden

Befreiung der Knochen von Muskulatur und Sehnen. Anschließend werden die Knochen in eine Petrischale mit RPMI 1640 bei 4°C gelegt. Unter Verwendung einer 1ml Spritze sowie einer 26G Nadel kann mit dem kalten RPMI das Knochenmark durch die eröffneten Epiphysen ausgespült und in der Petrischale aufgefangen werden. Das vollständige Ausspülen wird über eine Entfärbung des Knochens kontrolliert. Die entstandene Zellsuspension wird über ein 70 µm Sieb in ein 50ml Falcon filtriert um sie von groben Knochen- oder Fettresten zu trennen.

Aus der filtrierten Zellsuspension gilt es anschließend, eine größtmögliche Menge der nicht erwünschten Aspirationsanteile zu entfernen. Hierfür kommen mit der Phasentrennung und der Erythrozytenlyse zwei verschiedene Verfahren zum Einsatz. Die anfangs eingesetzte Phasentrennung zur Isolation erwies sich als sehr zeitaufwendig und zeigte nicht die gewünschte Selektivität in Bezug auf die Stammzellen, so dass sich später auf eine Erythrozytenlyse vor dem Cellsorting beschränkt wurde.

4.1.2.2 Phasentrennung des Knochenmarkspirats

Im ersten Schritt wird die filtrierte Zellsuspension bei 300 x g und 4 °C für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet erneut in 3ml RPMI resuspendiert und auf 3 ml Histopaque-1083 der Firma Sigma geschichtet. Es folgt eine weitere Zentrifugation bei 300 x g für 30 min ohne Bremse. Durch die spezifische Dichte des Histopaques von 1,083 g/ml kommt es während der Zentrifugation der Probe zu einer Auftrennung. Erythrozyten sedimentieren aufgrund ihres höheren Gewichts sowie einer Bindung an die enthaltene Polysucrose am Boden. Dem höheren Gewicht geschuldet sedimentieren die Granulozyten ebenfalls. Lymphozyten sowie mononukleäre Zellen verbleiben auf Grund der gleichen spezifischen Dichte in der mittleren, vom Histopaque vorgegebenen Phase. Am oberen Rand befindet sich klares Zellplasma. Die trübe Interphase mit den mononukleären Zellen wird mittels Pasteurpipette abgenommen und in einem letzten Waschschrift mit 15 ml RPMI bei 300 x g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die mononukleären Zellen nach einer Zellzahlbestimmung für die FACS-Analyse und das Sorting vorbereitet.

4.1.2.3 Erythrozytenlyse des Knochenmarkspirats

Eine alternative Methode der Entfernung unerwünschter Anteile aus dem Knochenmarkspirats besteht in der Durchführung einer Erythrozytenlyse. Auch hier

4 Methoden

wird die nach der Ausspülung der Knochen und Filtration entstandene Zellsuspension bei 300 x g, 4°C für 10 min und ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml der 1:10 verdünnten Red Blood Cell Lysis der Firma Miltenyi Biotech sorgfältig resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 300 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wird verworfen und das Pellet nach einer Zellzahlbestimmung für die FACS-Analyse und das Sorting vorbereitet.

4.1.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wird ein Aliquot des Pellets der mononukleären Zellen mit der gleichen Menge 0,2%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Die Suspension wird auf eine Neubauerkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop werden die angefärbten Zellen innerhalb der 4 Quadranten ausgezählt. Die Zellzahl errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = n/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

4.2 FACS

Die FACS[™] (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Analyse sowie die durchflusszytometrische Zellsortierung wurden freundlicherweise von Frau Dipl.Ing. Katharina Raba im Institut für Transplantation und Zelltherapeutika (ITZ), Abteilung Core Flow Cytometry Facility des Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt.

4.2.1 Grundprinzip

Die Durchflusszytometrie beruht auf der Messung von Streulicht und Fluoreszenzsignalen. Die Zellen fließen in einer Einzelzellsuspension hintereinander (im „Gänsemarsch“) durch eine Messkammer und kreuzen dabei einen Laser als monochromatische Lichtquelle. Trifft der Laser auf die Zelle entsteht ein Streulicht, das von Detektoren gemessen wird. In Abhängigkeit vom Winkel der Detektoren erhält man unterschiedliche Informationen. Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter oder FSC) misst die Brechung des Lichtes in einem flachem Winkel und ist in erster Linie von der Größe der Zelle abhängig. Das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter oder SSC) wird im rechten Winkel gemessen und ist abhängig von der Granularität der Zelle. Da nur durch diese beiden Messparameter jedoch keine ausreichenden Informationen gesammelt werden können um die Zellen zweifelsfrei zu identifizieren, werden

4 Methoden

fluoreszenzmarkierte Antikörper eingesetzt. Durch die spezifische Bindung sowohl an Oberflächen- als auch an intrazelluläre Antigene bieten die Antikörper die Möglichkeit einer selektiven Analyse der Zellen. Entsprechend des Absorptionsspektrums der gekoppelten Fluorophore werden diese mit dem Laser angeregt und das emittierte Licht von den Detektoren gemessen. Zur optischen Trennung der unterschiedlichen Emissionsspektren werden Farberteilerspiegel verwendet und die Detektoren mit zunehmenden Abstand vom Anregungslicht aufsteigend nummeriert (FL1, FL2...). Da die Fluoreszenzsignale gleichmäßig in alle Richtungen ausgesandt werden und die Lichtstreuung mit zunehmendem Winkel zum Laser-Strahl größer wird, sind die Detektoren für die Fluoreszenzen ebenfalls in einem rechten Winkel platziert (s. Abb. 3). Die multiparametrische Korrelation des Streulichts und der Fluorophore erlaubt eine quantitative Vermessung und molekulare Charakterisierung der Zellen (Rothe, 2007).

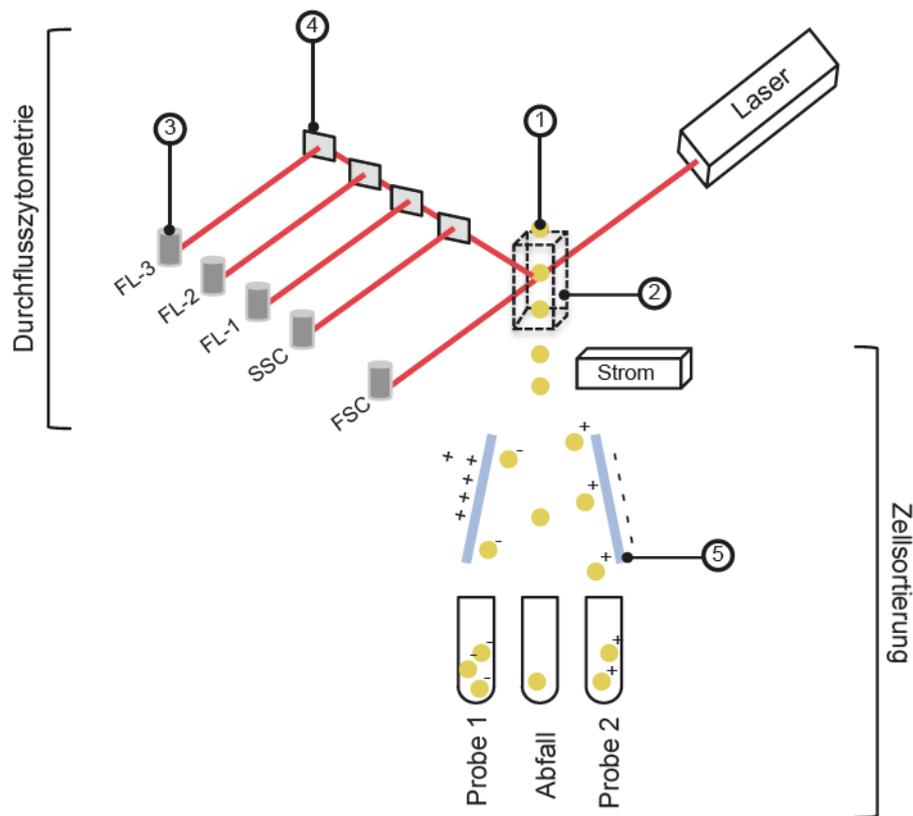


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie und der durchflusszytometrischen Zellsortierung

Die Zellen (1) fließen in Einzelzellsuspension durch die Messkammer (2) und kreuzen dabei den Laserstrahl. Das dadurch entstehende Streulicht wird von Detektoren (3) aufgefangen. Mithilfe von Farberteilerspiegeln (4) wird das Streulicht anhand der unterschiedlichen Emissionsspektren optisch aufgetrennt. Für die Zellsortierung werden die Zellen der ausgewählten Zellpopulation mittels einer Stromquelle elektrisch geladen. Durch die nachgeschalteten und ebenfalls elektrisch geladenen Platten (5) kommt es zur Ablenkung und Subfraktionierung der polarisierten Zellen. Abkürzungen: FSC, Forward Scatter; SSC, Side Scatter; FL-1-3, Nummerierung weiterer Detektoren.

4 Methoden

4.2.2 Prinzip des Cellsorting

Die durchflusszytometrische Zellsortierung beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Durchflusszytometrie und erfasst die gleichen Parameter. Zusätzlich können die zu sortierenden Zellen jedoch anhand der in der Durchflusszytometrie gewonnen Parametern subfraktioniert werden. Der Flusskammer ist eine Stromquelle unmittelbar nachgeschaltet. In Abhängigkeit der Analyse wird die jeweilige Einzelzellsuspension positiv oder negativ elektrisch geladen. In einem folgenden Spannungsfeld werden die Zellen entsprechend ihrer Ladungen zu den Polen abgelenkt und getrennt (s. Abb. 3). Es ist somit möglich, 3 verschiedenen Populationen zu trennen, wobei zwei genau definiert sind und eine dritte den nicht zuzuordnenden Abfall enthält.

4.2.3 FACS-Färbungen und Sorting Strategie

Zur Vorbereitung der FACS-Analyse und des *Cellsortings* wird das mittels Phasentrennung oder Erythrozytenlyse vorselektierte Knochenmarkaspirat mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die Zellen werden in 100µl PBS resuspendiert und in FACS Röhrchen überführt. Es folgte die Färbung mit:

- Anti-Prominin-1 als murines Ortholog zum humanen anti-CD133 und als hämatopoetischer Stammzellmarker
- Anti-CD-45, auch bekannt als leucocyte common antigen (LCA) und von allen hämatopoetischen Zellen mit Ausnahme reifer Erythrozyten und Thrombozyten exprimiert.
- Anti-CD-34 als Stammzellmarker für hämatopoetische Stammzellen.

Dafür werden jeweils 8 µl Antikörper / 10^7 Zellen der Antikörper aus Tabelle 2 eingesetzt.

Antigen	Konjugat	Konzentration	Spezifität
CD 34	eFluor 660	0,0002 µl / µg	Maus
Prominin-1	PE	0,03 µl / µg	Maus
CD 45	FITC	0,03 µl / µg	Maus

Tabelle 2: FACS Antikörper

Nach Ablauf der 15-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln bei 4°C folgt ein weiterer Waschschriff mit 2ml PBS. Die Suspension wird anschließend bei 600 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und somit nicht gebundene Antikörper entfernt, was die

4 Methoden

Hintergrundsignale während der Auswertung reduziert. Die Zellen werden in 300µl PBS aufgenommen und analysiert.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultur adhärenter endothelialer Zellen

Für die Untersuchungen werden zwei verschiedene endotheliale Zelllinien kultiviert:

- C57BL/6 Mouse Primary Dermal Endothelial Cells (mDMEC)
- C57BL/6 Mouse Primary Liver Sinusoidal Endothelial Cells (mLSEC)

Mit beiden Zelllinien wurde bis zu diesem Zeitpunkt im Labor nicht gearbeitet, so dass diese Zellreihen hier neu etabliert werden müssen. Die Anlieferung der Zellen erfolgt als kryokonservierte Zellsuspension, die nach Angaben des Herstellers in Kultur genommen wird.

Die im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, bei Raumtemperatur und unter einer sterilen Arbeitsbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt.

Beide Zelllinien werden in dem von der Herstellerfirma empfohlenen Endothelial Cell Medium bei 95% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂-Begasung und 37°C Raumtemperatur im Inkubator kultiviert. Die mDMEC wurden in 75cm² Gewebekulturflaschen gezüchtet. Die mLSEC zeigten in den 25cm² Gewebekulturflaschen ein besseres und homogeneres Wachstum als in den 75cm² Flaschen. Darüber hinaus benötigten die mLSEC gelatinierte Kulturflaschen. Die Lagerung der verwendeten Reagenzien erfolgte bei 4°C, ausschließlich zur Anwendung kam es zu einer kurzfristigen Erwärmung im Wasserbad auf 37°C. Das Wachstumsmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

4.3.1.1 Gelatinierung der Gewebekulturflaschen

Die mLSEC benötigen für ein optimales Wachstum gelatinierte Gewebekulturflaschen. Die Beschichtung erfolgt mit 0,2%iger Gelatinelösung für 30 Minuten im Inkubationsschrank. Die Gewebekulturflaschen werden vor der Überführung von Zellen mit PBS gewaschen.

4 Methoden

4.3.2 Passagieren von Zellen

Alle 2 - 3 Tage wird das Wachstumsmedium gewechselt. Erreichen die Zellen in den Gewebekulturflaschen eine konfluente Bewachung von 90% werden die Zellen passagiert. Dabei wird ein Teil der Zellen subkultiviert und die restlichen Zellen eingefroren. Das wachstumsabhängige *Splitting* der mLSEC erfolgt in einem Verhältnis von 2:1, das der dMEC in einem Verhältnis von 3:1, was 2 bzw. 3 Zellteilungen entspricht. Die Behandlung der Zellen folgt dabei einem festen Schema:

- Abnehmen des alten Mediums
- Waschen der Gewebekulturflasche mit 1xPBS um nicht adhärente oder tote Zellen zu entfernen
- Trypsinbehandlung der Zellen zur Ablösung der Zellen vom Boden der Gewebekulturflasche. Für die mLSEC wird 0,25%iges Trypsin, für die mDMEC 0,05%iges Trypsin verwendet.
- Inkubation der Zellen für 3-5 Minuten mit Trypsin im Inkubationsschrank
- Überprüfung der Ablösung der Zellen mittels eines Lichtmikroskops
- Neutralisierung der Trypsin-Zell Suspension durch Zugabe von Endothelzellmedium
- Zentrifugation der Suspension bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur
- Suspension des Zellpellets in 3ml Endothelzellmedium
- Überführung der Suspension in neue Gewebekulturflaschen und Kultivierung im Brutschrank

4.3.3 Kryokonservierung

Um über einen längeren Zeitraum mit den Zellen arbeiten zu können, werden Teile der einzelnen Passagen in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Die Zellen werden zunächst wie beim oben beschriebenen Passagieren trypsinisiert und zentrifugiert. Anschließend wird nach folgendem Schema vorgegangen:

- Suspendieren von 5×10^5 - $1,5 \times 10^6$ Zellen in 1 ml Einfriermedium
- Überführung der Suspension in Kryoröhrchen und Lagerung für einen Tag in einem Styroporbehälter bei -80°C
- Überführung der Kryoröhrchen am darauf folgenden Tag in den flüssigen Stickstoff

4 Methoden

4.3.4 Reaktivierung kryokonservierter Zellen

Um die kryokonservierten Zellen erneut in Kultur nehmen zu können werden sie wie folgt behandelt:

- Auftauen der Kryoröhrchen im auf 37°C erwärmten Wasserbad
- Überführung der Endothelzellen in Endothelzellmedium
- Zentrifugation der Suspension bei 200 x g für 5 min bei Raumtemperatur
- Resuspension des Pellets in Endothelzellmedium und Überführung in eine 25 cm² Gewebekulturflasche

Das Wachstum wird lichtmikroskopisch kontrolliert und die dMEC bei einer konfluenten Bewachung von 90% analog des unter 4.3.2 beschriebenen Schemas in eine 75 cm² Gewebekulturflasche überführt und die mLSEC gesplittet.

4.4 Live Cell Imaging

Das *Live Cell Imaging* ist als Methode in unserem Labor bereits etabliert, jedoch wurde der zeitliche Ablauf der Versuche sowie die Auswertung der erhobenen Daten für das murine System überprüft und optimiert.

4.4.1 Prinzip des Bioflux 200 Systems

Für das *Live Cell Imaging* wird das Bioflux 200 System der Firma Fluxion verwendet. Dieses System ermöglicht die Durchführung von Lebendzell-Assays unter kontrollierten Flussbedingungen.

Die Basis dieses Systems bildet eine Platte des Herstellers, die aus 24 paarig angeordnete Flusszellen besteht (s. Abbildung 6, Figur A). Diese Flusszellen bestehen jeweils aus zwei Reservoirien (Out- und Inwell), die über einen Kanal miteinander verbunden sind (s. Abbildung 6, Figur B). Der Boden der Kanäle bildet ein 180 µm dickes Glas, das wenn nötig mit einem Nährmedium beschichtet werden kann. Es können verschiedene Zellen ausgesät werden, so dass sich ein Monolayer adhärenter Zellen bildet, an dem weitere Untersuchungen stattfinden können. Durch das Glas lassen sich die Vorgänge in den Kanälen über ein Mikroskop beobachten und mit einer daran angeschlossene Kamera dokumentieren. Im Gesichtsfeld befinden sich zwei Kanäle, so dass Probe- und Kontrollkanal gleichzeitig beobachtet werden können. Des Weiteren besteht das System aus einem Controller, der mit Hilfe eines Kompressors Druck erzeugen kann. Über Verbindungsschläuche kann der Druck via einer an der

4 Methoden

Platte befestigten Schnittstelle (Interface) auf die Reservoirire übertragen werden. Durch den Druck wird eine sich im Inwell befindende Flüssigkeit in den Kanal und zum Outwell bewegt (s. Abbildung 6, Figur C). Die Richtung ist dabei frei einzustellen. In den Flusszellen lassen sich so Scherkräfte von 0 - 200 dyne/cm² erzeugen. 1 dyne/cm² ist definiert als die Kraft, die notwendig ist um 1g mit 1 cm/s² zu beschleunigen. Als Steuerelement fungiert eine Software auf dem an den Controller angeschlossenen Rechner. Die Dokumentation erfolgt über ein Lichtmikroskop der Firma Leica. Unter 20-facher Vergrößerung werden jeweils ab dem Start der Perfusion mit den CD 133⁺ KMSZ Fotos aufgenommen. Die Aufnahmedauer beträgt 1 Stunde bei einer Frequenz von 10 Bildern pro Minute.

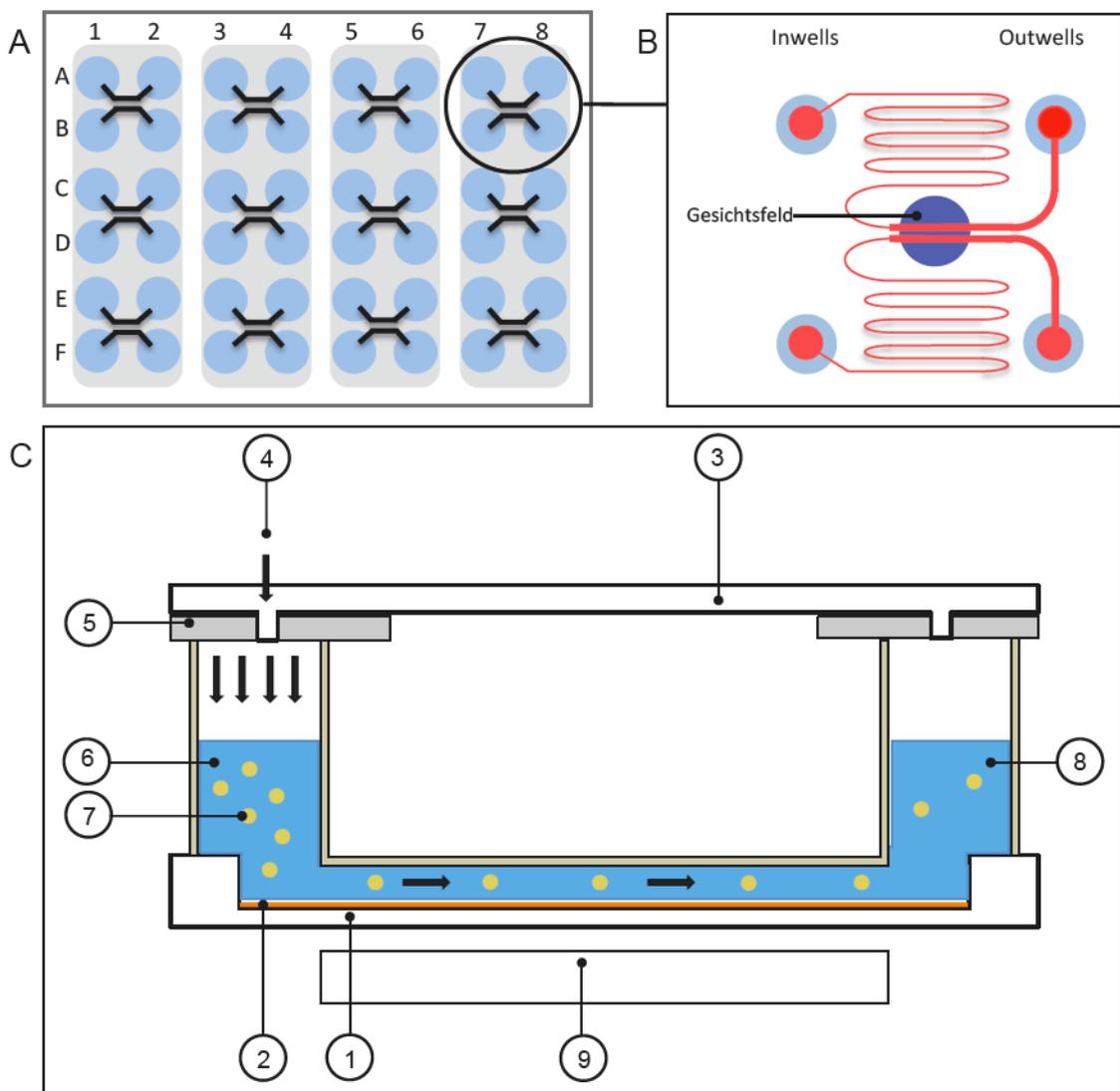


Abbildung 6: Übersicht der Flusszellen des Bioflux 200 Systems in verschiedenen Vergrößerungen.

- (A) Blick auf die Platte mit den 24 paarig angeordneten Flusszellen
- (B) Vergrößerung der Aufsicht auf zwei paarig angelegte Flusszellen

4 Methoden

Dargestellt sind In- und Outwells mit dem verbindenden Kanal sowie das Gesichtsfeld der Kamera für die Fotodokumentation

(C) Schematischer Querschnitt durch eine einzelne Flusszelle

Der Boden (1) der Flusszelle besteht aus Glas und kann wenn nötig mit einem Nährmedium (2) beschichtet werden um das Aussäen von Zellen zu ermöglichen. Der Flusszelle sitzt eine Schnittstelle (3) auf, über die der vom Controller (nicht dargestellt) aufgebaute Druck (4) durch die Abdichtungen (5) übertragen wird. Durch den aufgebauten Druck werden die sich im Inwell (6) befindenden Zellen (7) entlang der kultivierten Zellen Richtung Outwell (8) bewegt. Die Vorgänge lassen sich per Mikroskop beobachten (9).

4.4.2 Anzuchten eines konfluenten, endothelialen Monolayers im Bioflux Kanal

Das Anzuchten eines konfluenten, endothelialen Monolayers in den Flusszellen des Bioflux-Systems ist ein entscheidender Schritt zur Etablierung des Systems um die Adhäsion muriner CD133⁺ KMSZ entlang eines Endothelmonolayers zu untersuchen. Dieser Vorgang erstreckt sich über zwei Tage und folgt einem speziell für die murinen Endothelzellen modifiziertem Protokoll.

Am Tag 1 werden die Zellen nach folgendem Schema in den Kanal eingebracht:

- Beschichtung der Glasplatte am Boden des Kanals der Flusszellen mit Fibronectin in einer Konzentration von 200 µg/ml in Aqua bidest. Hierfür wird das Fibronectin in das Outwell Flusszelle pipettiert und mittels des Drucksystems in Richtung Inwell über die Glasplatte gezogen.
- Inkubation des mit Fibronectin gefüllten Kanals für 30 min
- Abnahme des im Outwell verbliebenen Fibronectins
- Spülung des Kanals mit 500 µl Endothelzellmedium bei einer Flussgeschwindigkeit von 5 dyne/cm² Richtung Inwell
- Entfernung des Endothelzellmedium aus den Kanälen
- Ernten der Zellen aus den Gewebekulturflaschen und Abnahme eines Aliquots von 1x10⁶ Zellen und Suspension in 75µl warmen Endothelzellmedium. Die restlichen Zellen werden erneut in Kultur genommen.
- Pipettieren der Zellen in das Outwell, anschließend werden die Zellen unter Mikroskopkontrolle in den Kanal gezogen. Der Kanal soll anschließend homogen mit Zellen gefüllt sein.
- Inkubation der mit Zellen gefüllten Kanäle über Nacht im Inkubator, so dass die Endothelzellen einen Zellrasen bilden.

4 Methoden

Am Tag 2 werden die Kanäle für 15 Minuten bei 1 dyne/cm² Richtung Outwell gespült um nicht adhärenente Zellen zu entfernen. Im Anschluss folgt die Beurteilung, ob die Zelldichte im Kanal ausreichend für die Co-Inkubation mit Stammzellen und Thrombozyten ist (s. Abbildung 7).

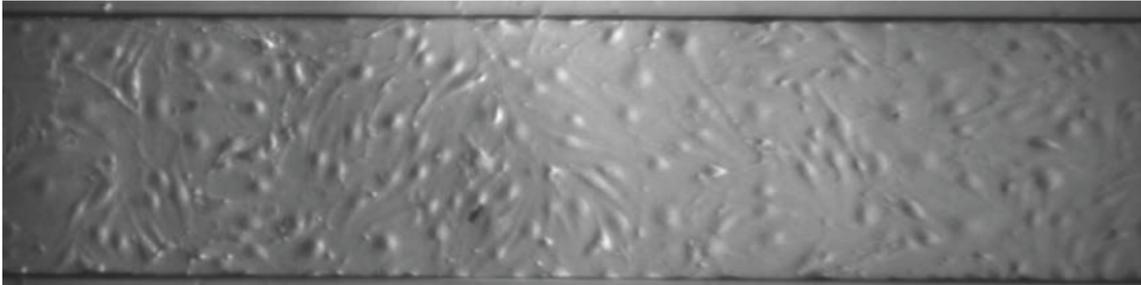


Abbildung 7: Konfluent mit Endothelzellen bewachsener Kanal, 20x Vergrößerung

4.4.3 Versuchsgruppen der Bioflux-Analyse

Für jeden Versuch werden zwei gleich stark konfluent bewachsene Biofluxkanäle in dem Gesichtsfeld der Kamera parallel ausgewertet. Der obere Kanal wird als Kontroll- und der untere als Probekanal verwendet.

4.4.3.1 *Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen oder sinusoidalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und PRP*

Der Endothelmonolayer wird dabei von den C57BL/6 *Mouse Primary Dermal Endothelial Cells* bzw. C57BL/6 *Mouse Primary Liver Sinusoidal Endothelial Cells* gebildet und die Kanäle der Flusskammer nach oben beschriebenem Protokoll vorbereitet. Entsprechend der beschriebenen Protokolle, erfolgt die Gewinnung von PRP und PPP sowie die Aufreinigung der CD133⁺ KMSZ. In das Inwell des Kontrollkanals werden 100µl des PPP und in das Inwell des Probekanal 100µl PRP pipettiert. Es folgt eine Perfusion der Endothelzellen in Richtung Outwell bei 1 dyne/cm², die nach 1 Minute gestoppt wird und der sich eine 15 minütige Inkubation im Brutschrank anschließt. Nach der Inkubation wird das PPP und PRP aus den Inwells abgenommen und die Kanäle mit Endothelzellmedium für 15 Minuten bei 1 dyne/cm² in Richtung Outwell gespült. Die In- und Outwells werden anschließend geleert. Zuletzt werden in jedes Inwell 1x10⁵ CD133⁺ KMSZ gelöst in 100 µl Endothelzellmedium gegeben und mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 dyne/cm² entlang der Endothelzellen

4 Methoden

Richtung Outwell gezogen. Dieser Vorgang wird über eine Stunde mittels der angeschlossenen Kamera dokumentiert.

4.4.3.2 Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und mittels ADP aktiviertem PRP

In dieser Versuchsreihe erfolgt eine Aktivierung des PRP von 40-50% mittels 0,5 µM ADP. Im Vergleich zum unter 4.4.3.1 beschriebenen Versuchsaufbau ersetzt das aktivierte PRP das nicht-aktivierte PRP im Probekanal.

4.4.3.3 Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PRP und mittels KF38789 vorinkubiertem PRP

Für den Endothelmonolayer werden die *C57BL/6 Mouse Primary Dermal Endothelial Cells* verwendet. Es erfolgt eine 1:100 Verdünnung der in 100mM vorliegenden Stocklösung des KF38789 mit DMSO. Das PRP wird in zwei Aliquote á 100 µl geteilt. Eine Probe wird mit 1 µl des verdünnten KF38789 inkubiert um den Effekt des P-Selektin Inhibitors auf die Adhäsion der CD133⁺ KMSZ bei der Co-Inkubation mit PRP zu untersuchen. Die für den Kontrollkanal verwendete Probe wird mit 1 µl DMSO inkubiert. Nach der Inkubationszeit der Proben von 20 Minuten erfolgt die 1-minütige Perfusion der Endothelzellen. Analog zu den oben beschriebenen Versuchen werden die beiden verschieden vorbehandelten Proben dafür in das Inwell der Flusszelle gegeben. Ab diesem Punkt ist das weitere Procedere identisch zu dem oben beschriebenen Versuchen.

4.5 Auswertung der Versuche

Die Auswertung der Versuche wird anhand der Photodokumentation der Perfusion des Endothels mit den CD133⁺ KMSZ durchgeführt. Sowohl an Probe- als auch an Kontrollkanal werden die adhärenen CD133⁺ KMSZ identifiziert indem eine Aufnahme zum Zeitpunkt t=0 mit einer Aufnahme t=60min verglichen wird (s. Abbildung 8). Durch die Akquirierung von Aufnahmen in 6 Sekunden-Intervallen kann bei Unsicherheiten, die entsprechende Regionen noch einmal genauer im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Dieses Hilfsmittel ermöglicht die Darstellung des Zeitpunkts der Adhäsion und somit die zweifelsfreie Identifizierung von KMSZ.

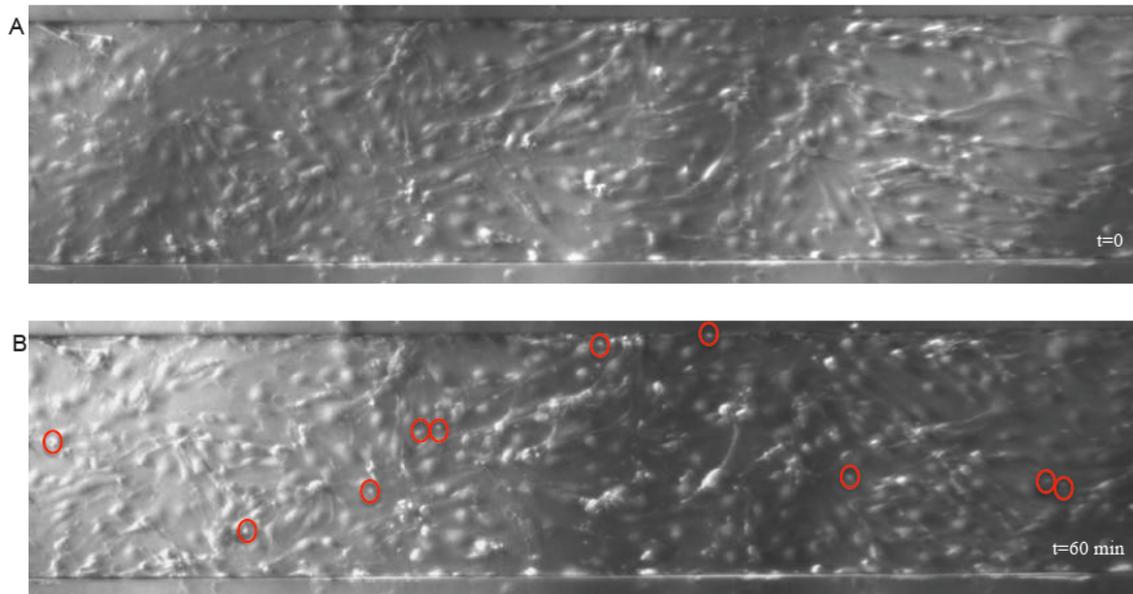


Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung einer Auswertung; 20x Vergrößerung.

Verglichen werden die Kanäle zum Zeitpunkt $t=0$ (oberes Bild) und $t=60\text{min}$ (unteres Bild). Die adherenten CD133^+ KMSZ sind mit roten Kreisen markiert.

4.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der erhobenen Daten werden mit den Statistikprogrammen Graphpad Prism 6 für Mac sowie Microsoft Excel 2011 für Mac durchgeführt. Entsprechend der vier Versuchsgruppen erfolgt die Zusammenfassung der in den einzelnen Versuchen erhobenen Daten zu Mittelwerten. Abweichungen vom Mittelwert werden mit der Standardabweichung (StdDev = standard deviation) angegeben. Die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen werden mithilfe des Zweistichproben-t-Tests für abhängige Stichproben hinsichtlich ihrer Signifikanz überprüft. Hierbei gilt ein zweiseitiges Signifikanzniveau von unter 5% als signifikant. Ein Signifikanzniveau von 0,1-1% wird als hoch signifikant, Werte unterhalb 0,1% als höchst signifikant bezeichnet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung der murinen Co-Kulturmodelle im Bioflux Live Cell Imaging System

5.1.1 Vergleich verschiedener Beschichtungen des Bioflux-Kanals zur Anzüchtung eines Endothel-Monolayers

Für die Kultivierung der Endothelzellen als Monolayer in den Bioflux-Kapillaren mussten zunächst die optimalen Kultivierungsbedingungen etabliert werden. Die Zellen hatten dabei mehrere Anforderungen zu erfüllen: Neben einem möglichst raschem, homogenem Wachstum war vor allem die Adhärenz der Zellen im Bioflux-Kanal unter Flussbedingungen das entscheidende Kriterium. Auch bei dem in den Versuchen eingesetzten physiologischen Fluss von $1 \text{ dyne} / \text{cm}^2$ sollten die Endothelzellen eine ausreichende Adhärenz aufweisen. Da die Endothelzellen auf der Glasoberfläche der Bioflux-Kanäle nicht ausreichend adhärent anwachsen, mussten unterschiedliche Beschichtungs-Reagenzien in den Bioflux-Kanälen getestet werden (s. Abbildung 9). Verglichen wurde dabei die Adhärenz der murinen Endothelzellen bei einer Beschichtung der Bioflux-Kanäle mit folgenden Reagenzien:

- 200 $\mu\text{g/ml}$ und 100 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin
- 2% und 0,2% Gelantine
- 60 $\mu\text{g/ml}$ und 30 $\mu\text{g/ml}$ Collagen

Bei allen verwendeten Beschichtungs-Reagenzien verteilten sich die nach der Trypsinierung kugelig konfigurierten Endothelzellen gleichmäßig in dem Bioflux-Kanal. Bereits nach 24h zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Beschichtungs-Reagenzien, nicht jedoch zwischen den verschiedenen Konzentrationen eines Reagenz.

Während sich in den mit Gelantine beschichteten Kanälen nicht alle Endothelzellen abgesetzt hatten, bildete sich in den mit Fibronectin und Collagen beschichteten Kanälen ein homogener und konfluenter Endothel-Monolayer. Die mit Fibronectin beschichteten Kanäle erschienen dabei noch etwas dichter bewachsen zu sein. Auch nach 48h zeigte sich in den Fibronectin-beschichteten Kanälen ein dichter Zellrasen, während sich die Zellen in den Gelantine- und Collagen-beschichteten Kanälen bereits wieder vereinzelt ablösten. Deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der Zellen

5 Ergebnisse

ließen sich erkennen, nachdem die Kanäle für 1 Stunde einem *shear stress* von 1 dyne / cm^2 ausgesetzt wurden.

In den bereits vorher weniger dicht bewachsenen, mit Gelantine und Collagen beschichteten Kanälen, führte der Fluss zu einem weiteren Verlust adhärenter Zellen. In den mit Fibronektin beschichteten Kanälen hingegen zeigte sich auch nach 1h Fluss mit 1 dyne / cm^2 ein erhaltener homogener Endothel-Monolayer. Im Vergleich der Fibronektin-Konzentrationen zeigte nach 48h Anwachsen und 1h *shear stress* der mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin beschichtete Kanal den dichtesten Zellrasen. Die Beschichtung der Kapillaren des Bioflux-Systems erfolgte dementsprechend mit 200 $\mu\text{g/ml}$ Fibronektin.

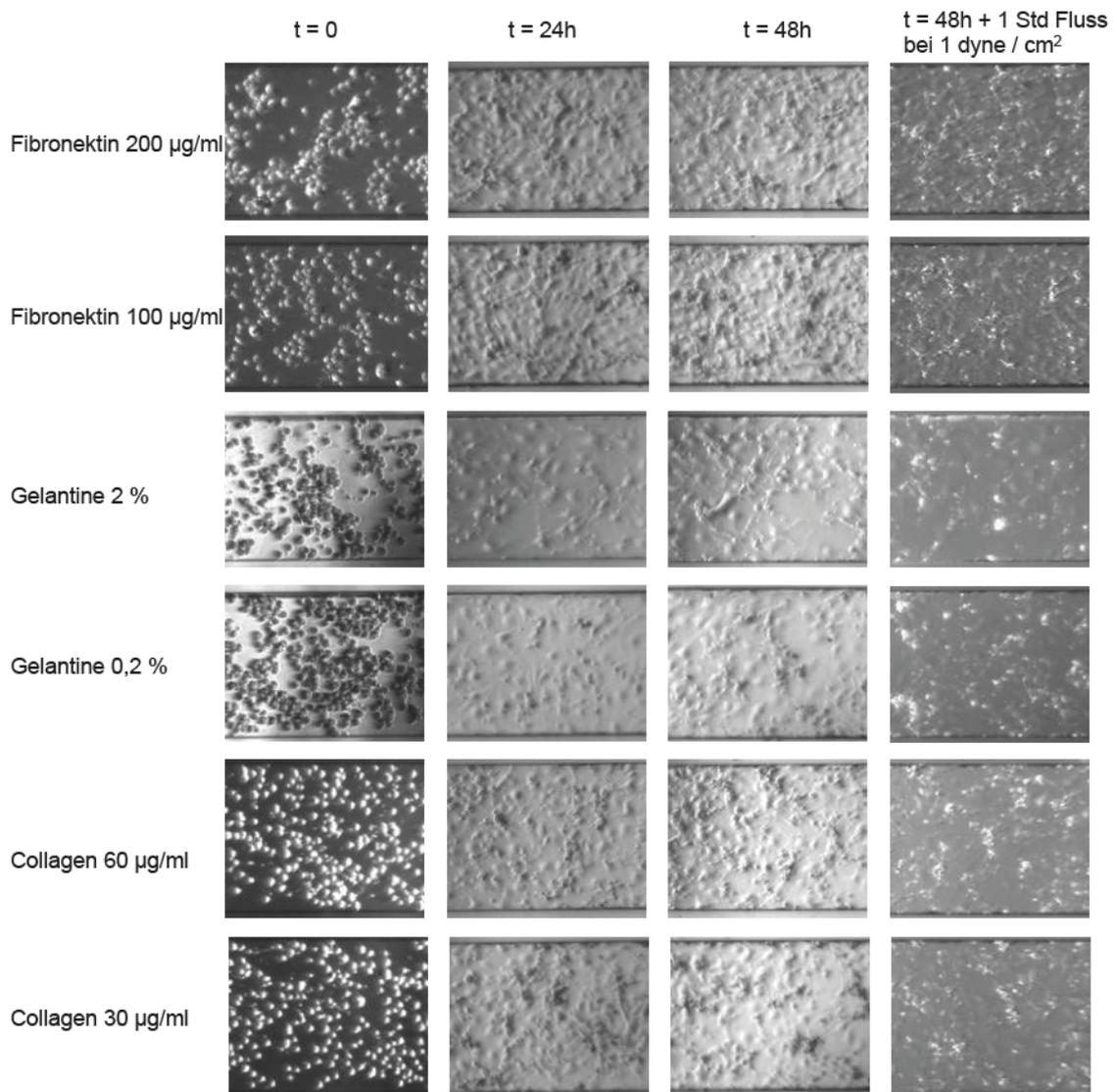


Abbildung 9: Vergleich der Zelladhäsion der murinen Endothelzellen in den Bioflux-Kanälen bei Verwendung unterschiedlicher Beschichtungs-Reagenzien und Konzentrationen, 20x Vergrößerung

5 Ergebnisse

5.1.2 Aktivierung muriner Thrombozyten mittels ADP

Zur Verifizierung der Rolle der Thrombozyten beim Homing von CD 133⁺ KMSZ wurden per ADP voraktivierte Thrombozyten in die Co-Kulturmodelle eingesetzt. Die Thrombozytenaktivierung wurde dafür mittels Lichttransmission-Aggregometrie nach Bohr gemessen. Eine Transmissionszunahme des murinen PRP von 40-50% wurde angestrebt. Voraussetzung für die Durchführung dieser Versuchsreihe war die Ermittlung einer durchschnittlichen ADP-Konzentration die zur angestrebten Voraktivierung der Thrombozyten führt, da keine Möglichkeit zur Eruiierung individueller Unterschiede der Thrombozyten-Spender hinsichtlich ihrer ADP-Sensitivität besteht.

Um den Einfluss externer Faktoren auf die murinen Thrombozyten zu minimieren, wurde für die Betäubung der Mäuse eine Inhalationsnarkose mit Isofluran verwendet. Auf die ebenfalls gängige Narkotisierung mit Ketavet und Rompun wurde aufgrund der antagonistischen Wirkung des Rompuns am α 2-Adrenorezeptor verzichtet. Des Weiteren musste beachtet werden, dass zwischen Blutentnahme und Co-Kultivierung eine Zeitdifferenz von ca. 4h liegt, in der das PRP bei Raumtemperatur gelagert wird. Die Zugabe von 0,125 μ M ADP bewirkte eine Transmissionszunahme von ca. 35%. 0,25 μ M ADP hatte eine Transmissionszunahme von ca. 40% zu Folge. Die Zugabe von 0,5 μ M ADP zu den murinen Thrombozyten führte zu einer Transmissionszunahme von ca. 50% (s. Abbildung 10). Zu einer Transmissionszunahme von ca. 65% führte die Zugabe von 1,25 μ M ADP. Darauf basierend werden die Thrombozyten in den entsprechenden Co-Kulturmodellen mit 0,5 μ M ADP voraktiviert.

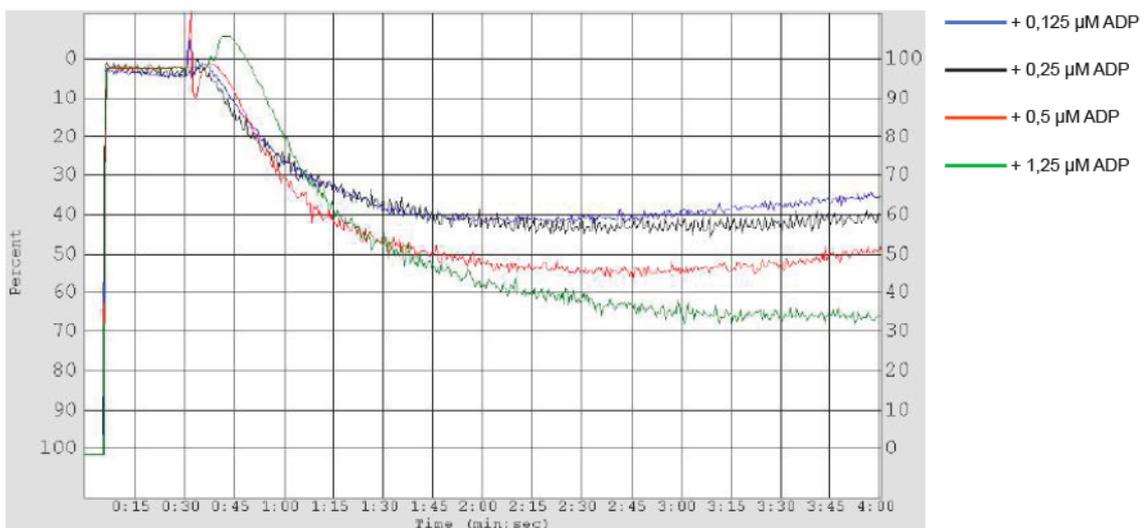


Abbildung 10: Aktivierung muriner Thrombozyten mittels unterschiedlicher ADP - Konzentrationen

5 Ergebnisse

5.1.3 FACS Sorting

Im Rahmen der Aufreinigung des murinen Knochenmarks wurden zwei unterschiedliche Protokolle etabliert. Zum Einen wurde das Knochenmarksaspirat zunächst per Phasentrennung mittels Histopaque, zum Anderen ausschließlich durch Erythrozytenlyse vorbehandelt.

Zur Selektion der in den Co-Kulturmodellen eingesetzten, für die Oberflächenmarker CD 34, CD 45 und CD 133 positiven KMSZ aus der Zellpopulation der primären Aufreinigung wurde das FACS *Sorting* eingesetzt. Die Spezifität und Sensitivität der einzelnen Antikörper wurde mittels Analyse einer ungefärbten sowie von einzelfärbten Proben untersucht.

In der ungefärbten Probe konnten keine für die oben genannten Oberflächenmarker CD 34, CD 45 und CD 133, positiven Zellen nachgewiesen werden (s. Abbildung 11, A). In den Einzelfärbungen zeigten sich nahezu alle Zellen der Lymphozyten-Population positiv für jeden der einzelnen Oberflächenmarker (s. Abbildung 11, B-D).

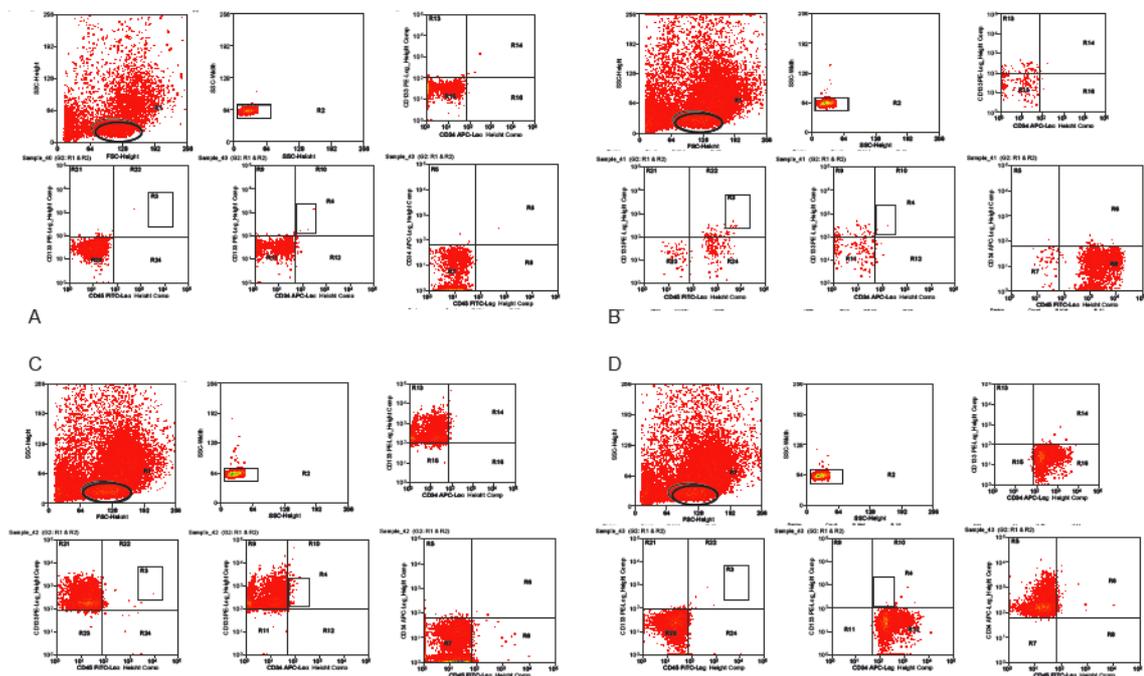


Abbildung 11: FACS Antikörper Tests

A) ungefärbte Probe; B) gefärbte Probe mit Anti-CD 45; C) gefärbte Probe mit Anti-CD 133; D) gefärbte Probe mit Anti-CD 34

5 Ergebnisse

Für das FACS Sorting wurde zunächst mittels SSC und FSC ein Gate um die Population der Lymphozyten gelegt (s. Abbildung 12, R1). Nach Aussortierung der Doubletten (Abbildung 12, R2) wurde ein weiteres Gate um die für die Oberflächenmarker CD 133 und CD 45 hochpositiven Zellen gelegt (Abbildung 12, R3). Diese Population wird zusätzlich hinsichtlich der Oberflächenmarker CD 133 und CD 34 analysiert. Die auch für diese Oberflächenmarker hochpositiven Zellen entsprechen der in den Co-Kultur Versuchen eingesetzten Population (Abbildung 12, R4).

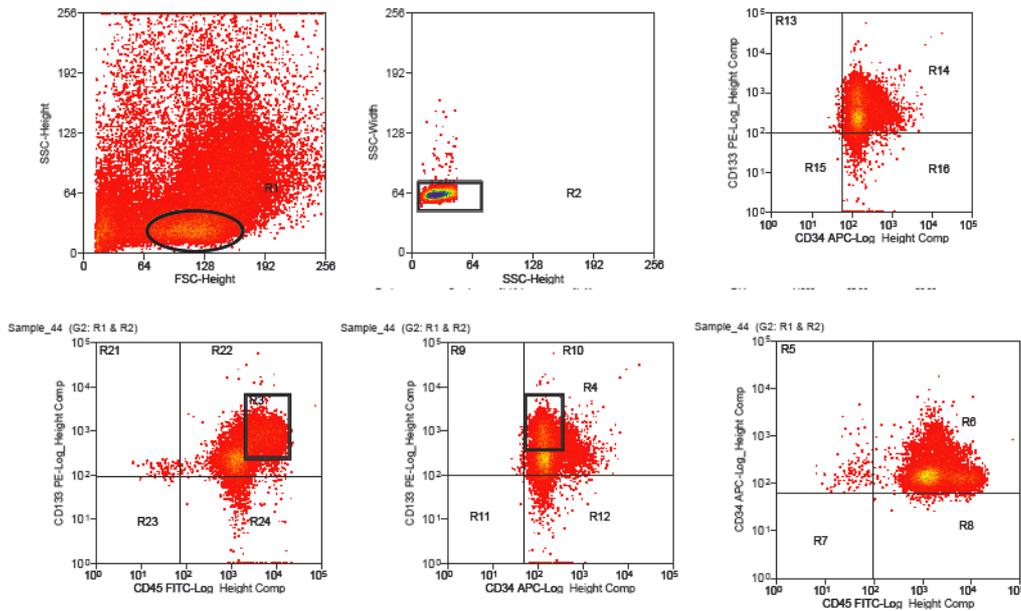


Abbildung 12: FACS Protokoll

Die mittels Phasentrennung vorbehandelte Zellsuspension erhielt durchschnittlich 26,88% (+/- 25% StdDev), die mittels Erythrozytenlyse behandelte Zellsuspension 25,37% (+/- 13% StdDev) Lymphozyten. Die Populationen der Lymphozyten wurden anschließend auf ihre Subpopulationen untersucht.

Die für CD 34 / CD 45 positive Subpopulation hatte nach der Phasentrennung einen Anteil von 86,55% (+/- 8% StdDev) und nach der Erythrozytenlyse von 90,1% (+/- 8% StdDev). Die für die Oberflächenmarker CD 34 / CD 133 positive Subpopulation hatte einen Anteil von 81,24% (+/- 14% StdDev) nach der Phasentrennung und 80,92% (+/- 7% StdDev) nach der Erythrozytenlyse. Einen Anteil von 35,31% (+/- 23% StdDev) nach Phasentrennung und 41,7% (+/- 29% StdDev) nach Erythrozytenlyse hatte die für die Oberflächenmarker CD 45 und CD 133 positive Subpopulation. Die für die späteren Co-Kultur Versuche verwendete, für die Oberflächenmarker CD 34, CD 45 und CD 133

5 Ergebnisse

positive Subpopulation wies nach der Phasentrennung einen Anteil von 33,88% (+/- 24% StdDev), nach der Erythrozytenlyse von 40,07% (+/- 31% StdDev) auf (s. Tabelle 3).

		Phasentrennung mittels Histopaque	Erythrozytenlyse
Relativer Anteil in % aus Zellpopulation nach primärer Knochenmarksaufreinigung	Lymphozyten	26,88 (+/- 25% StdDev)	25,37 (+/-13% StdDev)
Relativer Anteil in % aus der Lymphozytenpopulation	CD 34 ⁺ u. CD 45 ⁺	86,55 (+/- 8% StdDev)	90,10 (+/- 8% StdDev)
	CD 34 ⁺ u. CD 133 ⁺	81,24 (+/- 14% StdDev)	80,92 (+/- 7% StdDev)
	CD 45 ⁺ u. CD 133 ⁺	35,31 (+/- 23% StdDev)	41,70 (+/- 29% StdDev)
	CD 34 ⁺ u. CD 45 ⁺ u. CD 133 ⁺	33,88 (+/- 24% StdDev)	40,07 (+/- 31% StdDev)

Tabelle 3: Relativer Anteil der Subpopulationen nach primärer Aufreinigung des murinen Knochenmarks mittels Phasentrennung durch Histopaque gegenüber der Erythrozytenlyse

Im Vergleich der beiden etablierten Protokolle von Phasentrennung mittels Histopaque auf der einen Seite und der alleinigen Erythrozytenlyse auf der anderen Seite ergaben sich somit keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der relativen Verteilung der einzelnen Subpopulationen (s. Abbildung 13)

Die Verarbeitung des Knochenmarksaspirats mittels Phasentrennung benötigt ca. 1,5 Stunden, die Verarbeitung mittels Erythrozytenlyse nimmt ca. 45 min in Anspruch.

5 Ergebnisse

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde während der Versuche ein Protokollwechsel vollzogen und ausschließlich die Methode der Erythrozytenlyse angewandt.

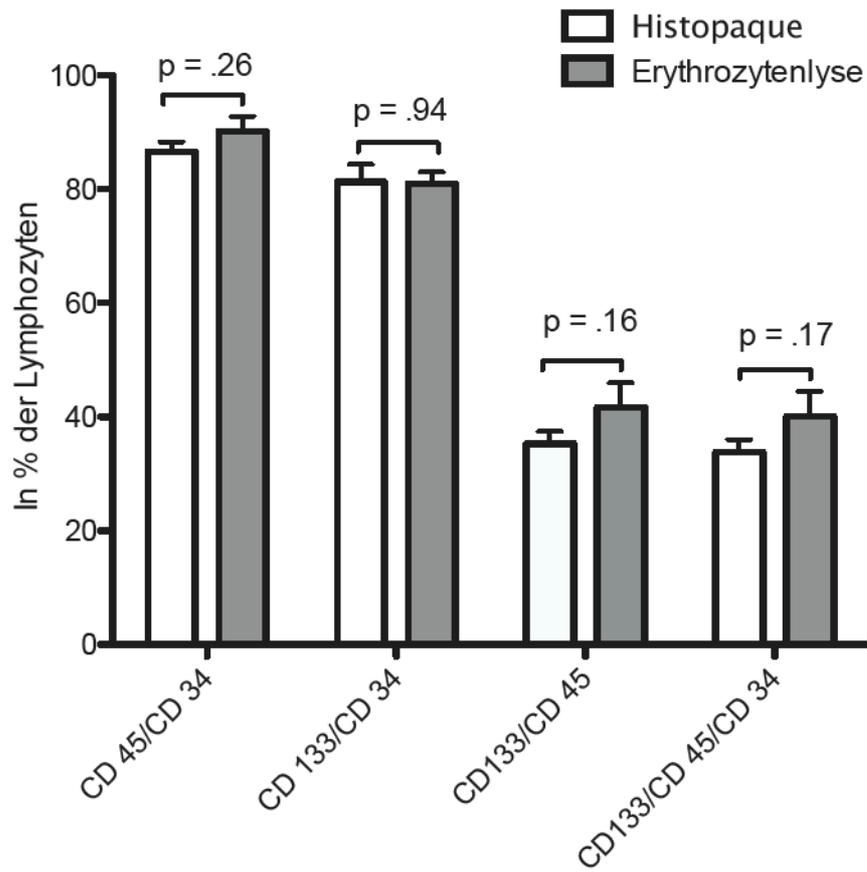


Abbildung 13: Verteilung der Subpopulationen der Lymphozyten nach Phasentrennung und Erythrozytenlyse

5 Ergebnisse

5.2 Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und PRP

Bei der Co-Inkubation des dMEC Monolayers (dermales Endothel) mit PPP zeigten sich im Schnitt 11,8 adhärenente murine CD 133⁺ KMSZ (+/-35% StdDev). Bei der Co-Inkubation mit PRP ließen sich durchschnittlich 16,6 adhärenente CD 133⁺ KMSZ (+/-29% StdDev) nachweisen (s. Tabelle 4).

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	rel. StdDev
PRP	12	19	19	22	11	16,6	0,346318928
PPP	7	13	15	16	8	11,8	0,290783576

Tabelle 4: Einzelergebnisse der Versuchsgruppen zur Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PRP und PPP

Somit führte die Co-Inkubation mit Thrombozyten zu einer durchschnittlichen Steigerung der Adhärenz muriner CD 133⁺ KMSZ auf 144 % (StdDev +/- 16%) entlang des dermalen Endothels im Vergleich zu der Co-Inkubation mit PPP. Dies entspricht unter Verwendung des Zweistichproben-t-Tests einer hoch signifikanten Steigerung ($p < 0,005$) (s. Abbildung 14).

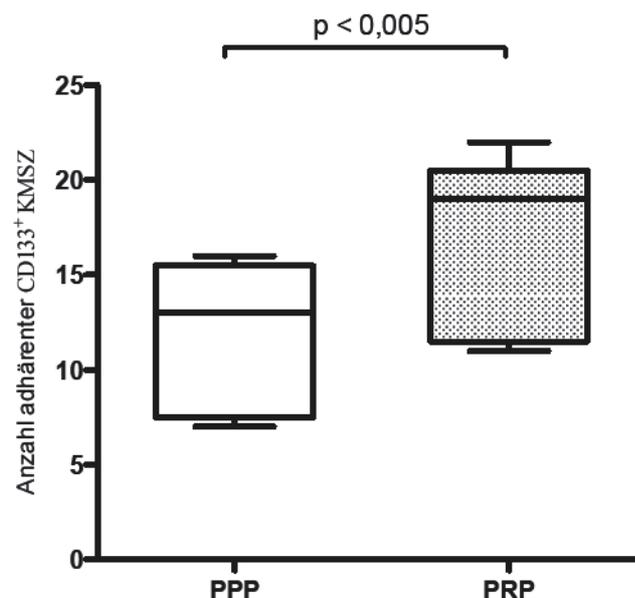


Abbildung 14: Durchschnittliche Anzahl adhärenente CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PPP und PRP

5 Ergebnisse

5.3 Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und mittels ADP aktiviertem PRP

Die Co-Inkubation des dMEC-Monolayers (dermales Endothels) mit PRP, das mit 0,5µM ADP voraktiviert wurde, führte zu einer mittleren Adhäsion von 15,2 murinen CD 133⁺ KMSZ (+/-13% StdDev). Die Co-Inkubation mit PPP führte in dieser Versuchsreihe zu einer durchschnittlichen Adhäsion von 9 murinen CD133⁺ KMSZ (+/-18% StdDev) (s. Tabelle 5).

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	rel. StdDev
PRP +ADP	15	16	14	18	13	15,2	0,126548579
PPP	7	10	9	11	8	9	0,175682092

Tabelle 5: Einzelergebnisse der Versuchsgruppen zur Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mittels ADP voraktiviertem PRP und PPP

Die Co-Inkubation mit per ADP aktiviertem PRP hatte somit eine durchschnittliche Steigerung der Adhärenz von CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels auf 171% (+/- 24% StdDev) gegenüber der Inkubation mit PPP zur Folge. Dies entspricht unter Verwendung des Zweistichproben-t-Test einer höchst signifikanten Steigerung ($p < 0,0005$) (s. Abbildung 15).

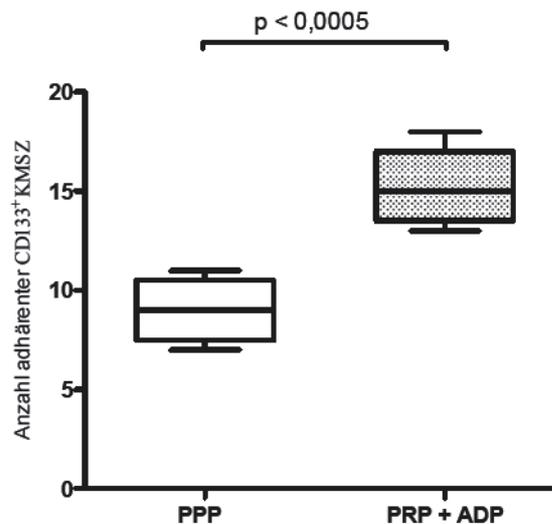


Abbildung 15: Durchschnittliche Anzahl adhärenter CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PPP und mittels ADP aktiviertem PRP

5.4 Vergleich der Adhäsionsraten von CD 133⁺ KMSZ nach Inkubation mit PRP und mittels ADP aktiviertem PRP entlang des dermalen Endothels

In den beiden unter 5.2 und 5.3 dargestellten Versuchsgruppen zeigten sich Unterschiede hinsichtlich der Steigerung der Adhäsionsrate. Dabei führte die Co-Inkubation mit PRP zu einer Steigerung der Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des dMEC-Monolayers auf 144% gegenüber der mit PPP co-inkubierten Kontrollgruppe. Die Co-Inkubation mit per ADP voraktiviertem PRP hatte eine Steigerung der Adhäsion auf 171% gegenüber der Kontrollgruppe zur Folge.

Die Voraktivierung des PRP durch ADP führte somit zu keiner signifikanten Steigerung der Adhäsion von CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels im Vergleich zum nicht aktivierten PRP. Diese Steigerung ist als Tendenz zu werten (s. Abbildung 16).

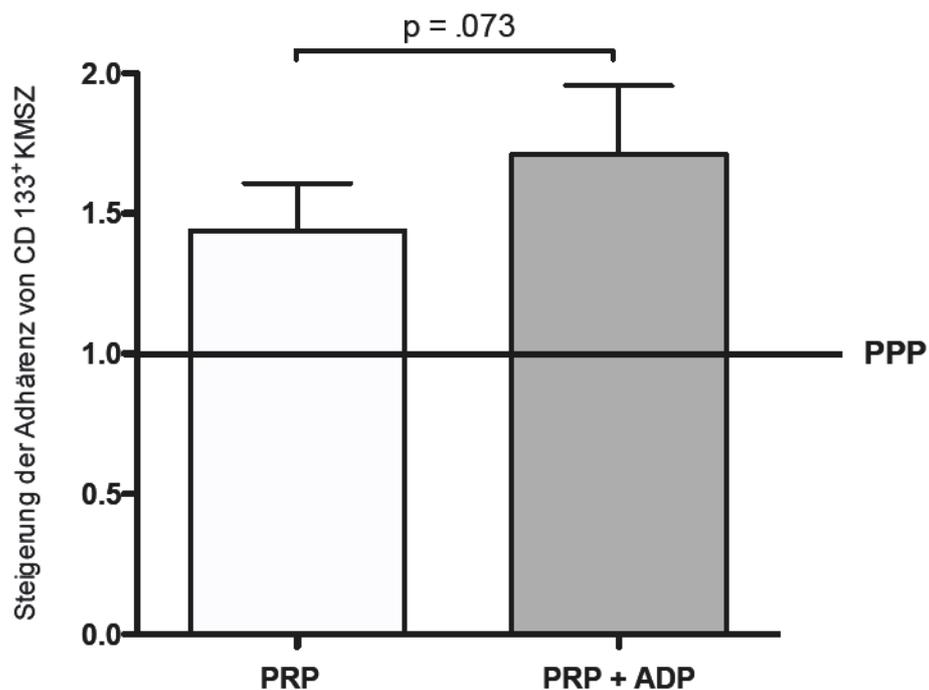


Abbildung 16: Vergleich der Adhäsionszunahme von CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels nach Inkubationen von PRP und mittels ADP voraktiviertem PRP in Relation zu PPP

5 Ergebnisse

5.5 Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang eines dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PRP und mittels KF38789 vorinkubiertem PRP

Die Co-Inkubation des dMEC Monolayers mit PRP, vorinkubiert mit dem spezifischen P-Selectin Inhibitor KF38789, führte zu einer durchschnittlichen Adhärenz von 11,2 murinen CD 133⁺ KMSZ (+/-28% StdDev). Die Co-Inkubation mit PRP führte in dieser Versuchsreihe zu durchschnittlich 8,6 adhärennten murinen CD 133⁺ KMSZ (+/-34% StdDev) entlang des dermalen Endothelmonolayers (s. Tabelle 6).

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	rel. StdDev
PRP + KF38789	8	16	14	11	7	11,2	0,280037083
PPP	7	12	10	6	8	8,6	0,342326598

Tabelle 6: Einzelergebnisse der Versuchsgruppen zur Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PRP und mittels KF38789 vorinkubiertem PRP

Die Co-Inkuabtion mit KF38789 vorinkubiertem PRP hatte folglich eine durchschnittliche Steigerung der Adhärenz auf 132% (+/- 35% StdDev) gegenüber der Co-Inkubation mit PRP zur Folge. Unter Anwendung des Zweiseitigen-t-Tests entspricht dies einer nicht signifikanten Steigerung (p .082) und ist als Tendenz zu werten (s. Abbildung 17).

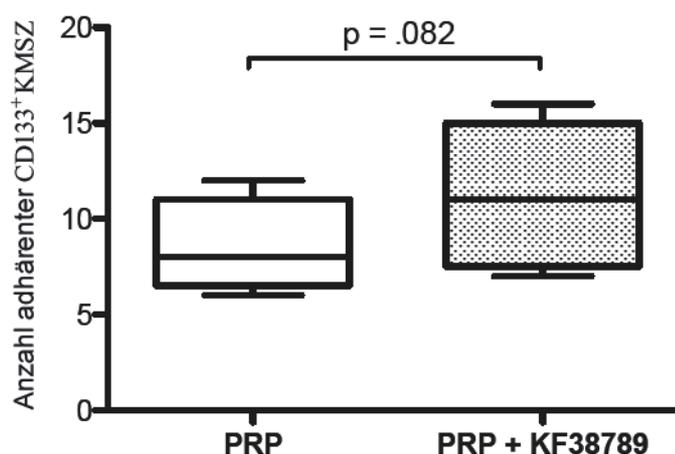


Abbildung 17: Durchschnittliche Anzahl adhärenter CD 133 KMSZ entlang des dermalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PRP und mittels KF38789 vorinkubierten PRP

5 Ergebnisse

5.6 Adhäsion muriner CD133⁺ KMSZ entlang eines hepatisch-sinusoidalen Endothelmonolayers bei Co-Inkubation mit PPP und PRP

Die Co-Inkubation des mLSEC Monolayers (hepatisch-sinusoidales Endothel) mit PRP führte zu einer durchschnittlichen Adhäsion von 17 murinen CD 133⁺ KMSZ (+/-80% StdDev). Bei der Co-Inkubation mit PPP kam es zu durchschnittlich 13 adhärenenten murinen CD 133⁺ KMSZ (+/-82% StdDev) (s. Tabelle 7).

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	rel. StdDEV
PRP	5	40	10	12	18	17	0,804399667
PPP	4	31	7	10	13	13	0,81589244

Tabelle 7: Einzelergebnisse der Versuchsgruppen zur Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des hepatisch-sinusoidalen Endothelmonolayers bei der Co-Inkubation mit PPP und PRP

Somit zeigte sich im leberspezifischen System bei der Co-Inkubation des sinusoidalen Endothels mit PRP einer Steigerung der Adhäsionsrate von murinen CD133⁺ KMSZ auf 131% (+/- 9% StdDev) im Vergleich zu der Co-Inkubation mit PPP. Unter Anwendung des Zweiseitigen-t-Test entspricht dies einer signifikanten Steigerung ($p < 0,05$) (s. Abbildung 18).

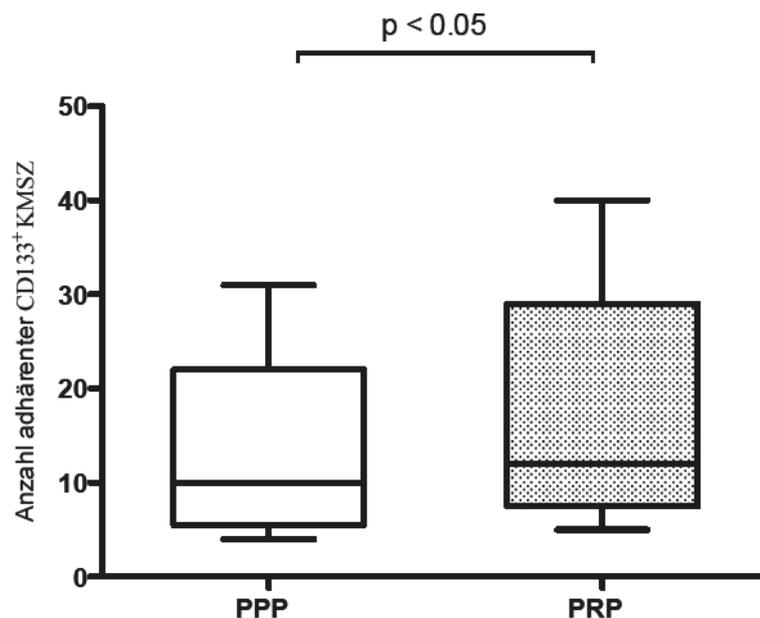


Abbildung 18: Durchschnittliche Anzahl adhärenenter CD 133+ KMSZ entlang des hepatisch-sinusoidalen Endothels bei der Co-Inkubation mit PPP und PRP

6 Diskussion

Ausgangspunkt dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass CD 133⁺ KMSZ das Potential zur Förderung der Leberregeneration nach Leberteilektomie haben (J. S. am Esch et al., 2012; Furst et al., 2007). Der zugrunde liegende Mechanismus, über den die KMSZ in die Abläufe der Leberregeneration eingreifen ist weiterhin unklar. Die in der Einleitung ausgiebig beschriebenen, etablierten Theorien (Jang et al., 2004; Schmelzle et al., 2013; Terada et al., 2002) haben jedoch eine gemeinsame Voraussetzung: Für die Transmigration von barrierebildenden Endothel hin zu den Hepatozyten müssen die Knochenmarkstammzellen am Endothel adhären und mit diesen interagieren. Unabhängig vom Wirkungsmechanismus der CD 133⁺ KMSZ führt somit die Steigerung der Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ entlang des Endothels der Leber zu einem erhöhten therapeutischen Nutzen.

Neben den CD 133⁺ KMSZ ist unter anderem auch für Thrombozyten eine protektive Wirkung in der Frühphase der Leberschädigung sowie positive Effekte für die Leberregeneration nachgewiesen worden. Es wurde unter anderem beobachtet, dass Thrombozyten in der Frühphase nach Leberteilektomien in den Sinusoiden kumulieren (Murata et al., 2007), sowie dass nach Lebertransplantationen die Zahl der adhärenen Thrombozyten am Leberendothel mit der Anzahl adhärenen polymorphonukleärer Leukozyten korreliert (Cywes et al., 1993).

Basierend auf diesen Erkenntnissen stellten wir die These auf, dass Thrombozyten die Adhäsion von CD 133⁺ KMSZ am Endothel fördern. Diese These soll mithilfe eines *Live Cell Imaging System* untersucht werden, da derzeit vor allem Erkenntnisse über die Adhäsionsmechanismen auf molekularer Ebene von zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen am Endothel des Knochenmarks sowie endothelialer Vorläuferzellen am beschädigten, vaskulären Endothel vorliegen (Kavanagh & Kalia, 2011). Ob diese Ergebnisse auch auf extramedulläres und speziell sinusoidales Endothel übertragbar sind verbleibt dabei weiterhin unklar und gilt es zu untersuchen.

6.1 Das murine Co-Kulturmodell im Bioflux Live Cell Imaging System

Grundsätzlich zeigt sich, dass das hier etablierte *Live Cell Imaging System* mit einem Monolayer dermalen muriner sowie hepatisch-sinusoidaler Endothelzellen für die Untersuchung des *Homings* der CD 133⁺ KMSZ geeignet ist. Es konnte somit ein

6 Diskussion

System für die Untersuchung an murinen Zellen analog zu den humanen Zellen etabliert werden.

Für die Untersuchungen des Einflusses der Thrombozyten auf das *Homing* der CD 133⁺ KMSZ wurden in unserem Versuchsaufbau zuerst die Endothelzellen mit den Thrombozyten co-kultiviert, anschließend erfolgte die Co-Kultivierung mit den CD 133⁺ KMSZ. Dieses Vorgehen beruht vor allem auf den Erkenntnissen von Daub et al., die bei der Co-Kultivierung von Thrombozyten und CD 34⁺ embryonalen Stammzellen eine Ausreifung der Stammzellen mit durchgreifender Änderungen in Hinblick auf Verhalten und Funktionalität der Zellen beschreiben (Daub et al., 2006). Da dieser Prozess jedoch in einem Zeitintervall von 5-10 Tagen stattfindet, scheint die Interaktion zwischen Thrombozyten und Stammzellen hinsichtlich der Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Stammzellenoberfläche in der frühen Phase des *Homings* der CD 133⁺ KMSZ eine untergeordnete Rolle zu spielen.

6.1.1 Beschichtungen des Bioflux-Kanals

Für die Untersuchungen des *Homings* CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen und sinusoidalen Mikro-Endothels wurde das *Bioflux Live Cell Imaging System* der Firma Fluxion verwendet.

In den Kapillaren dieses Systems zeigten die eingesetzten murinen Endothelzellen eine höchstmögliche Adhäsion in den Kanälen, wenn diese mit 200 µg/ml Fibronektin beschichtet wurden. Bei anderen Beschichtungsreagenzien oder -konzentrationen zeigten sich weniger dichte sowie weniger widerstandsfähige Zellrasen. Daher wurde diese Konzentration in den weiteren Versuchen eingesetzt.

6.1.2 Die Erythrozytenlyse ist der Phasentrennung bei der primären Aufreinigung überlegen

Für die primäre Aufreinigung des murinen Knochenmarksaspirats wurden zwei verschiedene Verfahren verglichen. Zum Einen die Phasentrennung mittels Histopaque, zum Anderen die reine Vorbehandlung durch Erythrozytenlyse. Hinsichtlich der prozentualen Verteilung der untersuchten Subpopulationen von Lymphozyten, CD 34⁺ / CD 45⁺, CD 34⁺ / CD 133⁺, CD 45⁺ / CD 133⁺ und CD 34⁺ / CD 45⁺ / CD 133⁺-Zellen ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede. Der Zeitaufwand für die

6 Diskussion

Verarbeitung des Knochenmarksaspirats mittels Phasentrennung ist jedoch doppelt so hoch wie bei der Verarbeitung mittels Erythrozytenlyse.

Diese Ergebnisse bestätigen die Aussagen von Sack et al., die die Depletion von Erythrozyten mittels Lyse als „Methode der Wahl“ beschreiben (Rothe, 2007). Bei der Isolation mononukleärer Zellen mittels Phasentrennung wird neben dem hohen Zeitaufwand auch noch ein schwer kontrollierbarer, allgemeiner Zellverlust beschrieben.

Dem gegenüber wurde jedoch von den Autoren ein selektiver Zellverlust bei der Erythrozytenlyse im Vergleich zur Phasentrennung beobachtet. Einen derartigen Zellverlust innerhalb der in unseren Versuchen eingesetzten Zellpopulation ließ sich, wie die oben genannten Ergebnisse jedoch zeigen, nicht nachweisen.

Auf Grund des verminderten zeitlichen Aufwandes und nahezu identischer Verteilung der zellulären Subpopulationen ist die primäre Aufreinigung des Knochenmarksaspirats mittels Erythrozytenlyse der Aufreinigung mittels Phasentrennung in dem hier etablierten Co-Kulturmodell überlegen.

6.1.3 Murine Thrombozyten sind sensibel für ADP

Die Aktivierung der murinen Thrombozyten wurde mittels Lichttransmissions-Aggregometrie gemessen. Um die in den Versuchen erwünschte Transmissionszunahme von 40-50% zu erreichen mussten 0,5 μM ADP eingesetzt werden. Im Vergleich zu der ADP-Konzentration von ca. 20 μM ADP die zu einer ähnlichen Transmissionszunahme bei humanen Thrombozyten führt, entspricht dies einer deutlich geringeren Konzentration (Dunne, Egan, McFadden, Foley, & Kenny, 2015). Die Aussage von Nylander et al., dass murine Thrombozyten deutlich sensitiver auf ADP reagieren als humane wird dadurch bestätigt. (Nylander, Mattsson, & Lindahl, 2006).

6.1.4 Murine CD 133⁺ KMSZ adhärieren am murinen dermalen Mikro-Endothel

Im Co-Kulturmodell muriner dermalen Endothelzellen mit PPP und anschließender Inkubation mit CD 133⁺ KMSZ unter Fluss ließen sich adhärente CD 133⁺ KMSZ nachweisen. Es wurde somit gezeigt, dass unter physiologischen Flussbedingungen eine Adhäsion von CD 133⁺ KMSZ an dermalen Endothelzellen stattfindet.

Diese Ergebnisse lassen sich mit den Beobachtungen von Mazo et. al bei ihren Untersuchungen am Knochenmark-Endothel von Mäusen vergleichen. Die

Arbeitsgruppe wies ein *Rolling* hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen entlang des Mikro-Endothels des Knochenmarks nach, das die Voraussetzung für eine anschließende Adhäsion bildet. Als zentrale Adhäsionsmoleküle auf Seiten des Mikro-Endothels des Knochenmarks wurden dabei P- und E-Selektin sowie das *Vascular cell adhesion protein 1* (VCAM-1) identifiziert (Mazo et al., 1998). Explizit wird jedoch darauf hingewiesen, dass eine Beteiligung weiterer Chemoattraktants und Adhäsionsmoleküle nicht ausgeschlossen ist.

Die Abhängigkeit des *Homings* hämatopoetischer Stammzellen am Endothel des Knochenmarks von P- und E- Selektin sowie VCAM-1 wurde von Frenette et al. in weiterführenden Untersuchungen bestätigt (Frenette, Subbarao, Mazo, von Andrian, & Wagner, 1998).

Rood et al. konnten in ihren Versuchen zwar die funktionelle und morphologische Vergleichbarkeit von *Human Umbilical Vein Endothelial Cell* (HUVEC) und dem Endothel des Knochenmarks nachweisen (Rood et al., 1999). Über die Vergleichbarkeit des Knochenmarkendothels und dermalen Endothels gibt es bis dato jedoch keine Studien. Dennoch stellen wir die These auf, dass P- und E-Selektin sowie VCAM-1 für die Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ am dermalen Endothel eine entscheidende Rolle spielen. Diese These muss jedoch durch weiterführende Experimente mit Antikörpern oder *Knock-out* Modellen weiter untersucht und verifiziert werden.

6.1.5 Murine CD 133⁺ KMSZ adhären am murinen hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothel

Auch im Co-Kulturmodell muriner hepatisch-sinusoidaler Endothelzellen mit PPP und anschließender Inkubation mit CD 133⁺ KMSZ unter Fluss zeigten sich adhären CD 133⁺ KMSZ. Das hier etablierte Co-Kulturmodell bestätigt so, dass unter physiologischen Flussbedingungen CD 133⁺ KMSZ auch am murinen hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothel adhären.

Dass sich die zugrunde liegenden Mechanismen der Adhäsion CD 133⁺ KMSZ am hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothel deutlich von anderen Endothelarten unterscheiden, lässt schon die einzigartige morphologischen Konstitution der LSEC mit allenfalls geringer Expression von P-Selektin vermuten. Weitere Bestätigung erhält diese Vermutung durch die Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich der Adhäsion von Lymphozyten an das sinusoidale Mikro-Endothel, so dass eine

vorbehaltlose Übertragung der Thesen zur Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ am Knochenmark-Endothel hier nicht möglich ist.

Wong et al. wiesen zwar nach, dass Leukozyten am hepatischen (sinusoidalen) Mikro-Endothel adhäreren, zeigten jedoch gleichzeitig auch, dass die Adhäsion im Gegensatz zu anderen Organen P-, E- und auch L-Selektin unabhängig ist. Die Autoren vermuten darüber hinaus eine Abhängigkeit der Leukozyten-Adhäsion von β_2 -Integrinen (Wong et al., 1997).

Lalor et al. zeigten in weiterführenden Untersuchungen, dass das *Vascular Adhesion Protein-1* (VAP-1) eine Hauptrolle bei der Adhäsion der Lymphozyten an hepatische Endothelzellen unter Flussbedingungen spielen könnte. Dieses Protein wird von anderen Zelllinien, wie beispielsweise HUVEC nicht exprimiert. Neben VAP-1 nennen die Autoren noch das *Intercellular Adhesion Molecul-1* (ICAM-1) und das *Vascular cell adhesion protein 2* (VCAM-2) als möglicherweise beteiligte Adhäsionsmoleküle. Auch diese Arbeitsgruppe bestätigte die allenfalls minimale Expressierung von P-Selektin auf der LSEC Oberfläche, wies dafür jedoch eine vermehrte Expression von E-Selektin im Vergleich zu HUVEC nach (Lalor et al., 2002).

Auch wenn die genauen Mechanismen für das Homing der CD 133⁺ KMSZ am hepatisch-sinusoidalen Endothel weiterhin unklar sind, bietet das hier etablierte Co-Kulturmodell die Grundlage für weitere, fokussierte Untersuchungen hinsichtlich dieser Fragestellung.

6.2 Thrombozyten fördern die Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels

Die Co-Inkubation des murinen dermalen Endothels mit PRP führte im Vergleich zur Co-Inkubation mit PPP zu einer signifikanten Steigerung auf 144 % der adhären CD 133⁺ KMSZ. Durch diese Beobachtung wird die Hypothese, dass Thrombozyten einen fördernden Effekt auf die Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen Endothels ausüben bestätigt.

Grundsätzlich sind zwei verschiedene Mechanismen die zu der Erhöhung führen denkbar.

- I. Die Co-Kultivierung des Endothels mit den Thrombozyten führt zu einer Aktivierung der Endothelzellen. Die Aktivierung führt zur Expression von

6 Diskussion

Adhäsionsmolekülen und somit zu einer vermehrten Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ an die Endothelzellen.

Diese These wird unter anderem von der Arbeitsgruppe Proença-Ferreira et al. bestätigt, die die Effekte von Thrombozyten auf die Expression von Adhäsionsmolekülen an *Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)* untersucht haben. Die Arbeitsgruppe wies nach, dass eine Co-Inkubation der Endothelzellen mit Thrombozyten unter der Voraussetzung von Zell-Zell-Kontakt zu einer geringen Expression von ICAM-1 sowie E-Selektin auf der Endotheloberfläche führt (Proença-Ferreira et al., 2014). Da ihre Expression über den NF-κB - Pfad reguliert wird, ist darüber hinaus die Expression zusätzlicher, in dieser Studie nicht weiter untersuchter, Adhäsionsmoleküle denkbar.

Neben der Aktivierung über direkten Zell-Zell-Kontakt von Endothelzellen und Thrombozyten beschreiben Nomura et al. auch die Möglichkeit einer indirekten Interaktion über *platelet derived micropartikels* (PMP). Hier führte die Stimulation der Endothelzellen mit PMP zu einer erhöhten Expression von ICAM-1 an den Endothelzellen und damit zu einer erhöhten Adhäsion von *human leukemic cells* (Nomura et al., 2001). Da die PMP Freisetzung jedoch erst bei starker Thrombozyten-Aktivierung, u.a. bei deutlich stärkerem *shear stress* als in unserem Modell eingesetzt wurde, stattfindet ist eine Beteiligung in diesem Versuchsaufbau als eher unwahrscheinlich anzusehen.

- II. Die Co-Kultivierung des Endothels mit den Thrombozyten führt zu einer Adhäsion der Thrombozyten am Endothel. Die adhärenen Thrombozyten fungieren anschließend als Anker für die zirkulierenden CD 133⁺ KMSZ.

Basierend auf diesem Mechanismus beschreiben Stellos et al. in ihrem Review von 2007, die Adhäsion endothelialer Vorläuferzellen in Folge von Endothelverletzungen. Dabei binden die Thrombozyten zunächst an das subendotheliale Kollagen. Die dadurch aktivierten Thrombozyten sezernieren den Chemoattraktant SDF-1. Dem SDF-1-Gefälle folgend kommen die endothelialen Vorläuferzellen mit den Thrombozyten in Kontakt und adhären P-Selektin / PSGL-1 vermittelt an die Thrombozyten (Stellos & Gawaz, 2007a).

Gegen eine übergeordnete Bedeutung der Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ an bereits adhärenen Thrombozyten in unserem Versuchsaufbau spricht, dass eine Bindung der

Thrombozyten an subendotheliales Kollagen nicht möglich ist. Am intakten Endothel findet unter physiologischen Flussbedingungen zwar ein kontinuierliches *Rolling* der Thrombozyten statt, adhärenente Thrombozyten sind jedoch ein seltenes Ereignis (Massberg et al., 1998).

Dennoch scheint die unter anderem von Langer et al. beschriebene, über die P-Selektin / PSGL-1-Achse vermittelte Bindung von endothelialen Vorläuferzellen an die immobilisierten Thrombozyten unter Fluss-Bedingungen auch für das *Homing* der hämatopoetischen Stammzellen ein interessanter Ansatzpunkt zu sein (Langer et al., 2006). Dieser wird in weiteren Untersuchungen mittels Blockierung durch Antikörper überprüft.

6.3 Die Aktivierung muriner Thrombozyten mittels ADP führt zu einer weiteren Steigerung der Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels

Die Co-Inkubation der Thrombozyten mit per ADP voraktiviertem PRP führte zu einer hoch signifikanten Steigerung der Adhärenz der CD 133⁺ KMSZ entlang des dermalen Endothels auf 171% im Vergleich zur Co-Inkubation mit PPP. Im Vergleich mit nicht voraktiviertem PRP lässt sich jedoch nur eine geringe, nicht-signifikante Steigerung feststellen. Diese Versuche bestätigen somit den fördernden Effekt von Thrombozyten auf die Adhäsion von CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels. Der Aktivierungszustand der Thrombozyten scheint in unserem Modell jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Adhäsion CD 133⁺ KMSZ infolge der ADP vermittelten Aktivierung der Thrombozyten, wäre eine dadurch induzierte vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Thrombozyten-Oberfläche.

Diese Theorie wird von den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Lev et al. gestützt, die nachwies, dass die Adhäsion endothelialer Vorläuferzellen an Thrombozyten sowohl unter statischen als auch unter Flussbedingungen signifikant erhöht ist wenn diese mittels ADP voraktiviert wurden. Die Adhäsion wird über die P-Selektin / PSGL-1 Achse vermittelt (Lev et al., 2006). Grundlage hierfür ist am ehesten die vermehrte Expression von P-Selektin auf der Thrombozyten-Oberfläche infolge der Aktivierung von P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptoren durch ADP (Leon, Ravanat, Freund, Cazenave, & Gachet, 2003).

Da die Adhärenzsteigerung der CD 133⁺ KMSZ entlang des Endothels in unseren Versuchen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Lev et al. nur gering ist, scheint dieser Mechanismus für das *Homing* der CD 133⁺ KMSZ am Endothel jedoch keine übergeordnete Rolle zu spielen.

Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass die vermehrte Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ entlang des Endothels durch die erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche infolge der Freisetzung der Dichtegranula aus den Thrombozyten bedingt ist. Diese Überlegung wird durch die Arbeiten von Zerr et al. sowie Golebieska et al. gestützt:

Die Stimulation der Thrombozyten führt zur Freisetzung der Dichtegranula der Thrombozyten. Auch das darin gespeicherte ADP der Thrombozyten wird somit freigesetzt (Golebiewska & Poole, 2015). Zerr et al. zeigten, dass eine Stimulierung des endothelialen P2Y₁-Rezeptors zu einer vermehrten Expression von P-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 auf der endothelialen Zelloberfläche führt (Zerr et al., 2011).

Dass auch dieser Mechanismus keine übergeordnete Rolle für das frühe *Homing* der CD 133⁺ KMSZ spielt lässt sich zum Einen dadurch erklären, dass deutlich längere Inkubationszeiten als in unseren Versuchsanordnungen für eine Expression der Adhäsionsmoleküle notwendig sind. Zum Anderen erfolgte die Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors in den Versuchen von Zerr et al. mittels eines starken Aktivators in Form von TNF- α . Von den in unseren Versuchen eingesetzten, voraktivierten Thrombozyten wurde in dieser Stufe der Aktivierung lediglich die Dichtegranula und damit u.a. ADP als schwacher Aktivator am P2Y₁-Rezeptor freigesetzt.

6.4 Die selektive P-Selektin Blockierung auf der Thrombozyten-Oberfläche führt zu keiner Reduktion der Adhärenz muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen dermalen Mikro-Endothels

Die P-Selektin- / PSGL-1- vermittelte Bindung von Thrombozyten und Monozyten aneinander sowie an das Endothel wurde bereits in den vorangehenden Abschnitten erwähnt und ist bereits bekannt und wurde Vielfach untersucht (Furie, Furie, & Flaumenhaft, 2001; Larsen et al., 1989).

6 Diskussion

Durch die Inkubation mit dem chemischen Antagonisten KF 38789 wurde P-Selektin in unseren Versuchen auf der Thrombozyten-Oberfläche selektiv und hoch effektiv blockiert, während E- und L-Selektin nicht betroffen waren (Ohta et al., 2001).

Entgegen der Erwartungen führte die P-Selektin Blockierung auf der Thrombozyten-Oberfläche hier nicht zu einer Reduzierung, sondern zu einer, wenn auch nicht-signifikanten, tendenziellen Steigerung der adhärenen CD 133⁺ KMSZ am murinen dermalen Mikro-Endothel auf 132%.

Unter der Annahme, dass der entscheidende Mechanismus für die Thrombozyten vermittelte Steigerung der Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ die Voraktivierung der Endothelzellen ist, bieten die Ergebnisse von Katayama et al. einen möglichen Erklärungsansatz. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass der auf der Oberfläche der hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen exprimierte PSGL-1 auch ein funktioneller E-Selektin Agonist ist (Katayama et al., 2003), was in späteren Arbeiten von Zou et al. (Zou et al., 2005) bestätigt wurde. Auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen wird neben P-Selektin auch E-Selektin exprimiert (Xia, McDaniel, Yago, Doeden, & McEver, 2004). Die Expressionsdichte von P-Selektin auf der Oberfläche der Thrombozyten ist deutlich dichter als die auf den Endothelzellen (McEver, 2001). Durch die Blockierung des P-Selektins auf der Thrombozytenoberfläche ist eine PSGL-1 vermittelte Adhäsion der KMSZ nicht möglich. Daraus folgt möglicherweise eine deutlich gesteigerte Interaktion zwischen dem endothelialen E-Selektin und PSGL-1 auf der KMSZ Oberfläche mit partieller Verdrängung der Interaktion spezifischer E-Selektin Liganden mit E-Selektin. Katayama et al. wiesen darüber hinaus nach, dass die E-Selektin Liganden auf murinen hämatopoetischem KMSZ im Gegensatz zu PSGL-1 auch mit α -4-Integrin auf der Endotheloberfläche interagieren.

Über diesen Mechanismus könnten konsekutiv zunehmend hämatopoetische KMSZ über ihren E-Selektin Liganden an α -4-Integrin auf der Endotheloberfläche binden. Denkbar ist, dass dieser Prozess kompensatorisch zu einer Überexpression von E-Selektin auf der Endotheloberfläche führt und so die geringe Zunahme der Adhäsion erklären kann.

Da die Thrombozyten-vermittelte Adhäsion in unserem Versuchsaufbau nicht unmittelbar über die P-Selektin-Achse vermittelt ist, sollte neben einer möglicherweise vermehrten Expression von E-Selektin in weiterführenden Untersuchungen darüber

hinaus eine etwaige erhöhte Expression weiterer denkbarer Adhäsionsmoleküle wie VCAM, ICAM oder VAP-1 evaluiert werden

6.5 Thrombozyten fördern die Adhäsion muriner CD 133⁺ KMSZ entlang des murinen hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothels

Die Co-Inkubation des murinen hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothels mit PRP und CD 133⁺ KMSZ zeigte im Vergleich zur Co-Inkubation mit PPP eine signifikante Steigerung der adhärenen CD 133⁺ KMSZ. Auch im leberspezifischen Co-Kulturmodell konnte somit die Hypothese bestätigt werden, dass Thrombozyten die Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ entlang des Mikro-Endothels fördern.

Vergleichbare Beobachtungen am hepatisch-sinusoidalen Endothel wurden von Lalor et al. veröffentlicht. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass eine Adhäsion von Thrombozyten auch zu einer Steigerung der Leukozyten-Adhäsion führt (Lalor, Herbert, Bicknell, & Adams, 2013).

Aufgrund der beschriebenen morphologischen Eigenschaften der LSEC sind die beiden konträren Hypothesen, dass die Thrombozyten-Adhäsion zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen führt als auch, dass die Thrombozyten selbst als eine Art Anker für hämatopoetische Stammzellen fungieren könnten, unter anderen Gesichtspunkten zu diskutieren als am dermalen Endothel.

Die These, dass eine Co-Kultivierung der sinusoidalen Endothelzellen mit Thrombozyten zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen oder Chemoattraktants am Endothel führt, wurde von Lalor et al. teilweise bestätigt. Bezüglich der direkten Adhäsion von Thrombozyten an LSEC konnte gezeigt werden, dass diese Gp1b, $\alpha_{IIb}\beta_{III}$ sowie $\alpha v\beta 3$ vermittelt ist und in den LSEC zu einer NF- κ B Aktivierung führt. Diese Aktivierung führt zu einer erhöhten Sekretion von CCL2 und CXCL8. Ohgo et al. wiesen der CCL2/CCR2-Achse eine entscheidende Rolle bei der Migration von mesenchymalen Stammzellen an dermalen Fibroblasten nach (Ohgo et al., 2015). Auch wenn es bisher keine Untersuchung hinsichtlich der Expression von CCR2 in hämatopoetischen Stammzellen gibt, ist dieser oder ein ähnlicher Mechanismus auch für die Migration der hämatopoetischen Stammzellen denkbar.

Des Weiteren zeigten Lalor et al., dass eine Blockierung des P-Selektins auf den Thrombozyten zu einer Reduzierung der adhärenen Lymphozyten führte. Diese

6 Diskussion

Beobachtung legt nahe, dass in diesem Fall die adhärenenten Thrombozyten einen Anker für die Leukozyten bildeten.

Da unsere eigenen Ergebnisse am murinen dermalen Endothel hinsichtlich der Adhäsion CD 133⁺ KMSZ dem jedoch widersprechen, ist eine Übertragung dieser Ergebnisse auf die Interaktion von Thrombozyten und CD 133⁺ KMSZ noch zu prüfen.

7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurden Co-Kulturmodelle sowohl für murine dermale als auch für murine hepatisch-sinusoidale Endothelzellen mit Thrombozyten und CD 133⁺ KMSZ in einem *Live Cell Imaging* System etabliert.

Darüber hinaus konnte ein fördernder Effekt von Thrombozyten auf die Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ entlang des Mikro-Endothels nachgewiesen werden. Sowohl der untersuchte Aktivierungsstatus der Thrombozyten, als auch die P-Selektin Expression auf der Thrombozytenoberfläche scheinen dabei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass der fördernde Effekt der CD 133⁺ KMSZ für die Leberregeneration nach Leberteilresektion durch Thrombozyten über ein vermehrtes *Homing* entlang des Mikro-Endothels verstärkt werden kann. Thrombozyten bieten somit einen therapeutischen Angriffspunkt zur Verbesserung der regenerationsmedizinischen Strategien im Rahmen ausgeprägter Leberteilresektionen.

Die in dieser Arbeit etablierten Co-Kulturmodelle bieten eine Grundlage zur Untersuchung der bis dato noch unzureichend bekannten Mechanismen, über die die Thrombozyten zu einer vermehrten Adhäsion der CD 133⁺ KMSZ am murinen dermalen und hepatisch-sinusoidalen Mikro-Endothel führen.

Es werden weiterführenden Studien benötigt, die neben der genauen Evaluierung der für die gesteigerte Adhäsion zugrundeliegenden Mechanismen untersuchen, inwiefern Thrombozyten auch zu einem vermehrten *Homing* zirkulierender Tumor- oder Entzündungszellen im Sinne einer Therapie-Limitierung führen.

V. Literaturverzeichnis

- Abulkhir, A., Limongelli, P., Healey, A. J., Damrah, O., Tait, P., Jackson, J., . . . Jiao, L. R. (2008). Preoperative portal vein embolization for major liver resection: a meta-analysis. *Ann Surg*, 247(1), 49-57. doi: 10.1097/SLA.0b013e31815f6e5b
- Aiuti, A., Webb, I. J., Bleul, C., Springer, T., & Gutierrez-Ramos, J. C. (1997). The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*, 185(1), 111-120.
- Albelda, S. M., Muller, W. A., Buck, C. A., & Newman, P. J. (1991). Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 114(5), 1059-1068.
- Alison, M. R., Poulson, R., Jeffery, R., Dhillon, A. P., Quaglia, A., Jacob, J., . . . Wright, N. A. (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 406(6793), 257. doi: 10.1038/35018642
- Almeida-Porada, G., Porada, C. D., Chamberlain, J., Torabi, A., & Zanjani, E. D. (2004). Formation of human hepatocytes by human hematopoietic stem cells in sheep. *Blood*, 104(8), 2582-2590. doi: 10.1182/blood-2004-01-0259
- am Esch, J. S., 2nd, Knoefel, W. T., Klein, M., Ghodsizad, A., Fuerst, G., Poll, L. W., . . . Hosch, S. B. (2005). Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*, 23(4), 463-470. doi: 10.1634/stemcells.2004-0283
- am Esch, J. S., Schmelzle, M., Furst, G., Robson, S. C., Krieg, A., Duhme, C., . . . Knoefel, W. T. (2012). Infusion of CD133+ bone marrow-derived stem cells after selective portal vein embolization enhances functional hepatic reserves after extended right hepatectomy: a retrospective single-center study. *Ann Surg*, 255(1), 79-85. doi: 10.1097/SLA.0b013e31823d7d08
- Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Pratico, D., Ratajczak, J., Vilaire, G., Kijowski, J., . . . Ratajczak, M. Z. (2002). Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol*, 30(5), 450-459.
- Best, J., Dolle, L., Manka, P., Coombes, J., van Grunsven, L. A., & Syn, W. K. (2013). Role of liver progenitors in acute liver injury. *Front Physiol*, 4, 258. doi: 10.3389/fphys.2013.00258
- Bonfanti, R., Furie, B. C., Furie, B., & Wagner, D. D. (1989). PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood*, 73(5), 1109-1112.
- Broering, D. C., Hillert, C., Krupski, G., Fischer, L., Mueller, L., Achilles, E. G., . . . Rogiers, X. (2002). Portal vein embolization vs. portal vein ligation for induction of hypertrophy of the future liver remnant. *J Gastrointest Surg*, 6(6), 905-913; discussion 913.
- Bussolati, B., Bruno, S., Grange, C., Buttiglieri, S., Deregibus, M. C., Cantino, D., & Camussi, G. (2005). Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol*, 166(2), 545-555. doi: 10.1016/S0002-9440(10)62276-6

- Civin, C. I., Mirro, J., & Banquerigo, M. L. (1981). My-1, new myeloid-specific antigen identified by a mouse monoclonal antibody. *Blood*, *57*(5), 842-845.
- Couvelard, A., Scoazec, J. Y., & Feldmann, G. (1993). Expression of cell-cell and cell-matrix adhesion proteins by sinusoidal endothelial cells in the normal and cirrhotic human liver. *Am J Pathol*, *143*(3), 738-752.
- Cywes, R., Mullen, J. B., Stratis, M. A., Greig, P. D., Levy, G. A., Harvey, P. R., & Strasberg, S. M. (1993). Prediction of the outcome of transplantation in man by platelet adherence in donor liver allografts. Evidence of the importance of prepreservation injury. *Transplantation*, *56*(2), 316-323.
- Daub, K., Langer, H., Seizer, P., Stellos, K., May, A. E., Goyal, P., . . . Gawaz, M. (2006). Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. *FASEB J*, *20*(14), 2559-2561. doi: 10.1096/fj.06-6265fje
- de Boer, H. C., Verseyden, C., Ulfman, L. H., Zwaginga, J. J., Bot, I., Biessen, E. A., . . . van Zonneveld, A. J. (2006). Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *26*(7), 1653-1659. doi: 10.1161/01.ATV.0000222982.55731.f1
- Duncan, A. W., Dorrell, C., & Grompe, M. (2009). Stem cells and liver regeneration. *Gastroenterology*, *137*(2), 466-481. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.044
- Dunne, E., Egan, K., McFadden, S., Foley, D., & Kenny, D. (2015). Platelet aggregation in response to ADP is highly variable in normal donors and patients on anti-platelet medication. *Clin Chem Lab Med*. doi: 10.1515/cclm-2015-0802
- Falati, S., Patil, S., Gross, P. L., Stapleton, M., Merrill-Skoloff, G., Barrett, N. E., . . . Gibbins, J. M. (2006). Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo. *Blood*, *107*(2), 535-541. doi: 10.1182/blood-2005-04-1512
- Farber, E. (1956). Similarities in the sequence of early histological changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetyl-amino-fluorene, and 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res*, *16*(2), 142-148.
- Fausto, N. (2004). Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*, *39*(6), 1477-1487. doi: 10.1002/hep.20214
- Fausto, N., & Campbell, J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev*, *120*(1), 117-130.
- Frenette, P. S., Johnson, R. C., Hynes, R. O., & Wagner, D. D. (1995). Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(16), 7450-7454.
- Frenette, P. S., Subbarao, S., Mazo, I. B., von Andrian, U. H., & Wagner, D. D. (1998). Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(24), 14423-14428.
- Furie, B., Furie, B. C., & Flaumenhaft, R. (2001). A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*, *86*(1), 214-221.

- Furst, G., Schulte am Esch, J., Poll, L. W., Hosch, S. B., Fritz, L. B., Klein, M., . . . Knoefel, W. T. (2007). Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology*, *243*(1), 171-179. doi: 10.1148/radiol.2431060625
- Gehling, U. M., Ergun, S., Schumacher, U., Wagener, C., Pantel, K., Otte, M., . . . Fiedler, W. (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, *95*(10), 3106-3112.
- Golebiewska, E. M., & Poole, A. W. (2015). Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, *29*(3), 153-162. doi: 10.1016/j.blre.2014.10.003
- Grompe, M. (2003). The role of bone marrow stem cells in liver regeneration. *Semin Liver Dis*, *23*(4), 363-372. doi: 10.1055/s-2004-815560
- Halazun, K. J., Al-Mukhtar, A., Aldouri, A., Malik, H. Z., Attia, M. S., Prasad, K. R., . . . Lodge, J. P. (2007). Right hepatic trisectionectomy for hepatobiliary diseases: results and an appraisal of its current role. *Ann Surg*, *246*(6), 1065-1074. doi: 10.1097/SLA.0b013e3181492795
- Holmes, N. (2006). CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*, *117*(2), 145-155. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02265.x
- Holmsen, H. (1994). Significance of testing platelet functions in vitro. *Eur J Clin Invest*, *24 Suppl 1*, 3-8.
- Hwang, J. H., Kim, S. W., Park, S. E., Yun, H. J., Lee, Y., Kim, S., & Jo, D. Y. (2006). Overexpression of stromal cell-derived factor-1 enhances endothelium-supported transmigration, maintenance, and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells Dev*, *15*(2), 260-268. doi: 10.1089/scd.2006.15.260
- Irie-Sasaki, J., Sasaki, T., Matsumoto, W., Opavsky, A., Cheng, M., Welstead, G., . . . Penninger, J. M. (2001). CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling. *Nature*, *409*(6818), 349-354. doi: 10.1038/35053086
- Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M., & Sharkis, S. J. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*, *6*(6), 532-539. doi: 10.1038/ncb1132
- Janowska-Wieczorek, A., Majka, M., Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Reca, R., Turner, A. R., . . . Ratajczak, M. Z. (2001). Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, *98*(10), 3143-3149.
- Katayama, Y., Hidalgo, A., Furie, B. C., Vestweber, D., Furie, B., & Frenette, P. S. (2003). PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood*, *102*(6), 2060-2067. doi: 10.1182/blood-2003-04-1212
- Kavanagh, D. P., & Kalia, N. (2011). Hematopoietic stem cell homing to injured tissues. *Stem Cell Rev*, *7*(3), 672-682. doi: 10.1007/s12015-011-9240-z
- Khandoga, A., Biberthaler, P., Enders, G., Teupser, D., Axmann, S., Luchting, B., . . . Krombach, F. (2002). P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock*, *18*(6), 529-535.

- Kollet, O., Shivtiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., . . . Lapidot, T. (2003). HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest*, *112*(2), 160-169. doi: 10.1172/JCI17902
- Krause, D. S., Ito, T., Fackler, M. J., Smith, O. M., Collector, M. I., Sharkis, S. J., & May, W. S. (1994). Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, *84*(3), 691-701.
- Krieg, A., Schulte Am Esch, J., Schmelzle, M., Tustas, R., El-Karmi, A., Hosch, S., & Knoefel, W. T. (2006). Stem cell factor levels do increase in patients subsequent to hepatectomy with the extent of parenchymal loss. *Transplant Proc*, *38*(10), 3556-3558. doi: 10.1016/j.transproceed.2006.10.111
- Kudo, S., Matsuno, K., Ezaki, T., & Ogawa, M. (1997). A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: hepatic sinusoids-lymph translocation. *J Exp Med*, *185*(4), 777-784.
- Lalor, P. F., Edwards, S., McNab, G., Salmi, M., Jalkanen, S., & Adams, D. H. (2002). Vascular adhesion protein-1 mediates adhesion and transmigration of lymphocytes on human hepatic endothelial cells. *J Immunol*, *169*(2), 983-992.
- Lalor, P. F., Herbert, J., Bicknell, R., & Adams, D. H. (2013). Hepatic sinusoidal endothelium avidly binds platelets in an integrin-dependent manner, leading to platelet and endothelial activation and leukocyte recruitment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, *304*(5), G469-478. doi: 10.1152/ajpgi.00407.2012
- Lange, C., Li, Z., Fang, L., Baum, C., & Fehse, B. (2007). CD34 modulates the trafficking behavior of hematopoietic cells in vivo. *Stem Cells Dev*, *16*(2), 297-304. doi: 10.1089/scd.2006.0056
- Langer, H., May, A. E., Daub, K., Heinzmann, U., Lang, P., Schumm, M., . . . Gawaz, M. (2006). Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res*, *98*(2), e2-10. doi: 10.1161/01.RES.0000201285.87524.9e
- Larsen, E., Celi, A., Gilbert, G. E., Furie, B. C., Erban, J. K., Bonfanti, R., . . . Furie, B. (1989). PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. *Cell*, *59*(2), 305-312.
- Lehwald, N., Duhme, C., Wildner, M., Kuhn, S., Furst, G., Forbes, S. J., . . . Schulte Am Esch, J. (2014). HGF and SDF-1-mediated mobilization of CD133+ BMSC for hepatic regeneration following extensive liver resection. *Liver Int*, *34*(1), 89-101. doi: 10.1111/liv.12195
- Leon, C., Ravanat, C., Freund, M., Cazenave, J. P., & Gachet, C. (2003). Differential involvement of the P2Y1 and P2Y12 receptors in platelet procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *23*(10), 1941-1947. doi: 10.1161/01.ATV.0000092127.16125.E6
- Lesurtel, M., Graf, R., Aleil, B., Walther, D. J., Tian, Y., Jochum, W., . . . Clavien, P. A. (2006). Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, *312*(5770), 104-107. doi: 10.1126/science.1123842
- Lev, E. I., Estrov, Z., Aboulfatova, K., Harris, D., Granada, J. F., Alviar, C., . . . Dong, J. F. (2006). Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*, *96*(4), 498-504.

V Literaturverzeichnis

- Liu, B., Liao, C., Chen, J., Gu, S., Wu, S., & Xu, Z. (2003). Significance of increasing adhesion of cord blood hematopoietic cells and a new method: platelet microparticles. *Am J Hematol*, *74*(3), 216-217. doi: 10.1002/ajh.10412
- Loges, S., Fehse, B., Brockmann, M. A., Lamszus, K., Butzal, M., Guckenbiehl, M., . . . Gehling, U. M. (2004). Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev*, *13*(3), 229-242. doi: 10.1089/154732804323099163
- Lopez, M. L., Kieling, C. O., Uribe Cruz, C., Osvaldt, A., Ochs de Munoz, G., Meurer, L., . . . Matte, U. (2014). Platelet increases survival in a model of 90% hepatectomy in rats. *Liver Int*, *34*(7), 1049-1056. doi: 10.1111/liv.12326
- MacPhee, P. J., Schmidt, E. E., & Groom, A. C. (1995). Intermittence of blood flow in liver sinusoids, studied by high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol*, *269*(5 Pt 1), G692-698.
- Massberg, S., Enders, G., Leiderer, R., Eisenmenger, S., Vestweber, D., Krombach, F., & Messmer, K. (1998). Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*, *92*(2), 507-515.
- Matsuo, R., Ohkohchi, N., Murata, S., Ikeda, O., Nakano, Y., Watanabe, M., . . . Ozaki, M. (2008). Platelets Strongly Induce Hepatocyte Proliferation with IGF-1 and HGF In Vitro. *J Surg Res*, *145*(2), 279-286. doi: 10.1016/j.jss.2007.02.035
- Mazo, I. B., Gutierrez-Ramos, J. C., Frenette, P. S., Hynes, R. O., Wagner, D. D., & von Andrian, U. H. (1998). Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, *188*(3), 465-474.
- McEver, R. P. (2001). Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation. *Thromb Haemost*, *86*(3), 746-756.
- Michalopoulos, G. K. (2007). Liver regeneration. *J Cell Physiol*, *213*(2), 286-300. doi: 10.1002/jcp.21172
- Miraglia, S., Godfrey, W., Yin, A. H., Atkins, K., Warnke, R., Holden, J. T., . . . Buck, D. W. (1997). A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood*, *90*(12), 5013-5021.
- Mizrak, D., Brittan, M., & Alison, M. (2008). CD133: molecule of the moment. *J Pathol*, *214*(1), 3-9. doi: 10.1002/path.2283
- Mohle, R., Moore, M. A., Nachman, R. L., & Rafii, S. (1997). Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood*, *89*(1), 72-80.
- Murata, S., Ohkohchi, N., Matsuo, R., Ikeda, O., Myronovych, A., & Hoshi, R. (2007). Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg*, *31*(4), 808-816. doi: 10.1007/s00268-006-0772-3
- Neubauer, K., Wilfling, T., Ritzel, A., & Ramadori, G. (2000). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene expression in liver sinusoidal endothelial cells during liver injury and repair. *J Hepatol*, *32*(6), 921-932.
- Newsome, P. N., Hussain, M. A., & Theise, N. D. (2004). Hepatic oval cells: helping redefine a paradigm in stem cell biology. *Curr Top Dev Biol*, *61*, 1-28. doi: 10.1016/S0070-2153(04)61001-5

- Newsome, P. N., Johannessen, I., Boyle, S., Dalakas, E., McAulay, K. A., Samuel, K., . . . Plevris, J. N. (2003). Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*, *124*(7), 1891-1900.
- Nomura, S., Tandon, N. N., Nakamura, T., Cone, J., Fukuhara, S., & Kambayashi, J. (2001). High-shear-stress-induced activation of platelets and microparticles enhances expression of cell adhesion molecules in THP-1 and endothelial cells. *Atherosclerosis*, *158*(2), 277-287.
- Nylander, S., Mattsson, C., & Lindahl, T. L. (2006). Characterisation of species differences in the platelet ADP and thrombin response. *Thromb Res*, *117*(5), 543-549. doi: 10.1016/j.thromres.2005.04.026
- Ohgo, S., Hasegawa, S., Hasebe, Y., Mizutani, H., Nakata, S., & Akamatsu, H. (2015). Senescent dermal fibroblasts enhance stem cell migration through CCL2/CCR2 axis. *Exp Dermatol*, *24*(7), 552-554. doi: 10.1111/exd.12701
- Ohta, S., Inujima, Y., Abe, M., Uosaki, Y., Sato, S., & Miki, I. (2001). Inhibition of P-selectin specific cell adhesion by a low molecular weight, non-carbohydrate compound, KF38789. *Inflamm Res*, *50*(11), 544-551.
- Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., . . . Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, *95*(3), 952-958.
- Peters, L. L., Cheever, E. M., Ellis, H. R., Magnani, P. A., Svenson, K. L., Von Smith, R., & Bogue, M. A. (2002). Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiol Genomics*, *11*(3), 185-193. doi: 10.1152/physiolgenomics.00077.2002
- Proenca-Ferreira, R., Brugnerotto, A. F., Garrido, V. T., Dominical, V. M., Vital, D. M., Ribeiro Mde, F., . . . Conran, N. (2014). Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS One*, *9*(2), e89012. doi: 10.1371/journal.pone.0089012
- Rastogi, P., White, M. C., Rickard, A., & McHowat, J. (2008). Potential mechanism for recruitment and migration of CD133 positive cells to areas of vascular inflammation. *Thromb Res*, *123*(2), 258-266. doi: 10.1016/j.thromres.2008.03.020
- Rood, P. M., Gerritsen, W. R., Kramer, D., Ranzijn, C., von dem Borne, A. E., & van der Schoot, C. E. (1999). Adhesion of hematopoietic progenitor cells to human bone marrow or umbilical vein derived endothelial cell lines: a comparison. *Exp Hematol*, *27*(8), 1306-1314.
- Roskams, T. A., Theise, N. D., Balabaud, C., Bhagat, G., Bhathal, P. S., Bioulac-Sage, P., . . . West, A. B. (2004). Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*, *39*(6), 1739-1745. doi: 10.1002/hep.20130
- Rothe, G. (2007). Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In U. Sack, A. Tárnok, & G. Rothe (Eds.), *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (pp. 27-70). Basel: Karger.

- Savage, B., Almus-Jacobs, F., & Ruggeri, Z. M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell*, *94*(5), 657-666.
- Schindl, M. J., Redhead, D. N., Fearon, K. C., Garden, O. J., Wigmore, S. J., Edinburgh Liver, S., & Transplantation Experimental Research, G. (2005). The value of residual liver volume as a predictor of hepatic dysfunction and infection after major liver resection. *Gut*, *54*(2), 289-296. doi: 10.1136/gut.2004.046524
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H. L., . . . Reid, L. M. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J Exp Med*, *204*(8), 1973-1987. doi: 10.1084/jem.20061603
- Schmelzle, M., Splith, K., Andersen, L. W., Kornek, M., Schuppan, D., Jones-Bamman, C., . . . Robson, S. C. (2013). Increased plasma levels of microparticles expressing CD39 and CD133 in acute liver injury. *Transplantation*, *95*(1), 63-69. doi: 10.1097/TP.0b013e318278d3cd
- Schmitt, A., Guichard, J., Masse, J. M., Debili, N., & Cramer, E. M. (2001). Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. *Exp Hematol*, *29*(11), 1295-1302.
- Scoazec, J. Y., & Feldmann, G. (1991). In situ immunophenotyping study of endothelial cells of the human hepatic sinusoid: results and functional implications. *Hepatology*, *14*(5), 789-797.
- Shmelkov, S. V., Butler, J. M., Hooper, A. T., Hormigo, A., Kushner, J., Milde, T., . . . Rafii, S. (2008). CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*, *118*(6), 2111-2120. doi: 10.1172/JCI34401
- Snippert, H. J., van Es, J. H., van den Born, M., Begthel, H., Stange, D. E., Barker, N., & Clevers, H. (2009). Prominin-1/CD133 marks stem cells and early progenitors in mouse small intestine. *Gastroenterology*, *136*(7), 2187-2194 e2181. doi: 10.1053/j.gastro.2009.03.002
- Starlinger, P., Haegele, S., Offensperger, F., Oehlberger, L., Pereyra, D., Kral, J. B., . . . Assinger, A. (2015). The Profile of Platelet alpha-Granule Released Molecules Affects Postoperative Liver Regeneration. *Hepatology*. doi: 10.1002/hep.28331
- Stellos, K., & Gawaz, M. (2007a). Platelet interaction with progenitor cells: potential implications for regenerative medicine. *Thromb Haemost*, *98*(5), 922-929.
- Stellos, K., & Gawaz, M. (2007b). Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost*, *33*(2), 159-164. doi: 10.1055/s-2007-969029
- Stellos, K., Gnerlich, S., Kraemer, B., Lindemann, S., & Gawaz, M. (2008). Platelet interaction with progenitor cells: vascular regeneration or inquiry? *Pharmacol Rep*, *60*(1), 101-108.
- Stenberg, P. E., McEver, R. P., Shuman, M. A., Jacques, Y. V., & Bainton, D. F. (1985). A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, *101*(3), 880-886.
- Storey, R. F., Newby, L. J., & Heptinstall, S. (2001). Effects of P2Y(1) and P2Y(12) receptor antagonists on platelet aggregation induced by different agonists in

- human whole blood. *Platelets*, 12(7), 443-447. doi: 10.1080/09537100120085450
- Tajima, F., Tsuchiya, H., Nishikawa, K., Kataoka, M., Hisatome, I., & Shiota, G. (2010). Hepatocyte growth factor mobilizes and recruits hematopoietic progenitor cells into liver through a stem cell factor-mediated mechanism. *Hepatol Res*, 40(7), 711-719. doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00647.x
- Terada, N., Hamazaki, T., Oka, M., Hoki, M., Mastalerz, D. M., Nakano, Y., . . . Scott, E. W. (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416(6880), 542-545. doi: 10.1038/nature730
- Than, N. N., & Newsome, P. N. (2014). Stem cells for liver regeneration. *QJM*, 107(6), 417-421. doi: 10.1093/qjmed/hcu013
- Theise, N. D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P. B., Morgan, G., Teperman, L., . . . Krause, D. S. (2000). Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 32(1), 11-16. doi: 10.1053/jhep.2000.9124
- Truant, S., Oberlin, O., Sergent, G., Lebuffe, G., Gambiez, L., Ernst, O., & Pruvot, F. R. (2007). Remnant liver volume to body weight ratio > or =0.5%: A new cut-off to estimate postoperative risks after extended resection in noncirrhotic liver. *J Am Coll Surg*, 204(1), 22-33. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2006.09.007
- Uchida, N., Buck, D. W., He, D., Reitsma, M. J., Masek, M., Phan, T. V., . . . Weissman, I. L. (2000). Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14720-14725. doi: 10.1073/pnas.97.26.14720
- Vassilopoulos, G., Wang, P. R., & Russell, D. W. (2003). Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422(6934), 901-904. doi: 10.1038/nature01539
- Voermans, C., Rood, P. M., Hordijk, P. L., Gerritsen, W. R., & van der Schoot, C. E. (2000). Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 18(6), 435-443. doi: 10.1634/stemcells.18-6-435
- Weyrich, A. S., Elstad, M. R., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Moore, K. L., Morrissey, J. H., . . . Zimmerman, G. A. (1996). Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J Clin Invest*, 97(6), 1525-1534. doi: 10.1172/JCI118575
- Wisse, E., De Zanger, R. B., Charels, K., Van Der Smissen, P., & McCuskey, R. S. (1985). The liver sieve: considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of Disse. *Hepatology*, 5(4), 683-692.
- Wong, J., Johnston, B., Lee, S. S., Bullard, D. C., Smith, C. W., Beaudet, A. L., & Kubes, P. (1997). A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature. *J Clin Invest*, 99(11), 2782-2790. doi: 10.1172/JCI119468
- Xia, L., McDaniel, J. M., Yago, T., Doeden, A., & McEver, R. P. (2004). Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. *Blood*, 104(10), 3091-3096. doi: 10.1182/blood-2004-02-0650

V Literaturverzeichnis

- Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., . . . Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, *90*(12), 5002-5012.
- Yong, K. L., Watts, M., Shaun Thomas, N., Sullivan, A., Ings, S., & Linch, D. C. (1998). Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). *Blood*, *91*(4), 1196-1205.
- Zerr, M., Hechler, B., Freund, M., Magnenat, S., Lanois, I., Cazenave, J. P., . . . Gachet, C. (2011). Major contribution of the P2Y(1)receptor in purinergic regulation of TNFalpha-induced vascular inflammation. *Circulation*, *123*(21), 2404-2413. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.002139
- Zou, X., Shinde Patil, V. R., Dagia, N. M., Smith, L. A., Wargo, M. J., Interliggi, K. A., . . . Goetz, D. J. (2005). PSGL-1 derived from human neutrophils is a high-efficiency ligand for endothelium-expressed E-selectin under flow. *Am J Physiol Cell Physiol*, *289*(2), C415-424. doi: 10.1152/ajpcell.00289.2004

VI. Danksagung

Mein besonderer und größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Schulte am Esch für die Bereitstellung des Themas, die engagierte Betreuung von Beginn der ersten Vorversuche bis zu den Korrekturen der vorliegenden Arbeit sowie seinen persönlich und fachlich sehr hilfreichen Ratschlägen. Seine Begeisterungsfähigkeit war ein starker Antrieb.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau Maria Wecker. Mit ihrer unerschütterlichen Unterstützung leistete sie einen großen Beitrag zum Gelingen des vorliegenden Projektes.

Frau Dr. Constanze Duhme danke ich für die hilfreichen Korrekturen im Rahmen des Verfassens dieser Arbeit sowie kompetente Beratung in methodischen Fragen.

Frau Dipl.Ing. Katharina Raba vom Institut für Transplantation und Zelltherapeutika (ITZ) danke ich herzlichst für Durchführung der durchflusszytometrischen Zellsortierung sowie die aufmunternden Worte bei Rückschlägen während der Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Geschwistern bedanken, die mir jederzeit unterstützend, beratend und motivierend zur Seite stehen.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Partnerin Inga für ihre Unterstützung, ihr Verständnis sowie ihre Liebe.

VII. Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, 01.06.2016, Julian Philipp Kirchner

Unterschrift