

**Aus der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dieter Häussinger**

Einfluss von PDGF-Rezeptor- vermittelten Signalwegen auf die Differenzierung hepatischer Sternzellen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Louisa Catharina Adolph

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. N. Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. D. Häussinger

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. R. Ahmadian

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Hepatische Sternzellen (HSC) sind hauptsächlich für ihre Beteiligung an der Entstehung einer Leberfibrose in Folge chronischer Parenchymschädigung bekannt. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen mesenchymale Stammzellen (MSC) der Leber mit einem hohen Entwicklungspotential sind und im Disse'schen Raum zwischen Hepatozyten und Endothelzellen ihre Stammzellnische haben.

Während der stammzellbasierten Leberregeneration der Ratte (partielle Hepatektomie/ 2-Acetylaminofluoren Schädigungsmodell) konnte eine signifikante Expressionssteigerung des PDGFR β (*platelet-derived growth factor receptor*) und seiner Liganden PDGF-BB und -DD beobachtet werden. Zudem spielt der PDGFR-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion mesenchymaler Stammzellen und fördert deren Proliferation, Migration und Überleben. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss PDGF-vermittelter Signalwege auf die Entwicklung von hepatischen Sternzellen zu untersuchen.

Der Einsatz der Liganden PDGF-BB und -DD führte in isolierten hepatischen Sternzellen der Ratte zu einer erhöhten Zellteilung, welche durch Crenolanib als spezifischen Inhibitor der PDGF-Rezeptoren α und β inhibiert werden konnte. Erstaunlicherweise zeigte sich unter Behandlung mit Crenolanib zudem eine Induktion der Differenzierung von Sternzellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen. Diese äußerte sich durch eine Induktion der Expression epithelialer Progenitorzell- (CK19, EpCAM) und Hepatozytenmarker (CK18, HNF4 α , FOXA3, Albumin, BSEP) in hepatischen Sternzellen. Weiterführende Experimente zeigten, dass diese hepatische Differenzierung zumindest zum Teil durch eine verstärkte Phosphorylierung der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) p38 unter Crenolanib vermittelt wird. Inhibition der p38 Phosphorylierung durch den Inhibitor SB203580 konnte die Expressionssteigerung einzelner epithelialer Marker unter Crenolanib-Behandlung in Sternzellen verhindern. Zudem zeigte sich unter Crenolanib eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren, unter anderem eine Hochregulierung der Wachstumsfaktoren *hepatocyte growth factor* (HGF) sowie der *fibroblast growth factors* (FGF) 7, 10 und 15, für die ein Einfluss auf eine hepatische Differenzierung beschrieben wurde.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass eine Inhibition der PDGFR-vermittelten Proliferation in isolierten Sternzellen der Ratte unter Mitwirkung der MAPK p38 eine Differenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen induziert. Somit scheinen Proliferation und Differenzierung konkurrierende Prozesse zu sein und die PDGFR-vermittelten Signalwege eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Entwicklung von hepatischen Sternzellen einzunehmen.

Abstract

Hepatic stellate cells (HSC) are liver-resident mesenchymal stem cells (MSC) with high developmental potential. They differentiate not only into adipocytes and osteocytes as known for typical MSC, but also into liver epithelial cells such as hepatocytes and bile duct cells. During stem cell-based liver regeneration in rats (partial hepatectomy/2-acetylaminoflourene injury model) a significant upregulation of the MSC-marker platelet-derived growth factor receptor β (Pdgfr β) and its ligands (Pdgf-b and -d chains) was observed.

To investigate the relevance of Pdgf signaling for developmental fate decisions, HSC were isolated from rat liver and treated with the Pdgf receptor inhibitor Crenolanib or natural Pdgfr ligands such as Pdgf-bb and dd. Both ligands increased HSC proliferation and the inhibitor Crenolanib diminished ligand-induced cell expansion significantly. Interestingly, Crenolanib treatment (100 nM) evoked DNA synthesis in HSC, which was not associated with cell proliferation but with an induction of hepatic differentiation as indicated by the upregulation of epithelial progenitor (cytokeratin 19, epithelial cell adhesion molecule) and hepatocyte markers (cytokeratin 18, hepatocyte nuclear factor 4 α , forkhead box protein A3, albumin, bile salt export pump). Initiation of hepatic differentiation by Crenolanib was found to be dependent, at least in part, on MAPK p38 as investigated by application of the p38 MAPK inhibitor SB203580. Crenolanib also elevated the expression of fibroblast growth factors such as Hgf, Fgf7, Fgf 10 and Fgf15 known to support hepatic differentiation of stem/progenitor cells. In contrast to this, proliferative signals via Pdgf ligands impeded epithelial cell marker expression in HSC.

In conclusion, Pdgfr signaling is pivotal for balancing the opposing processes cell proliferation and differentiation in HSC. Therefore, Pdgfr signaling is essential for the regulation of developmental fate decisions in HSC and stem cell-based liver regeneration.

Abkürzungsverzeichnis

Die Standardeinheiten des SI-Systems wurden nicht aufgenommen.
Fremdsprachige Begriffe sind kursiv dargestellt.

2AAF	2-Acetylaminofluoren
Abi1	<i>abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADSC	<i>adipose-derived stem cell</i> / Stammzelle des Fettgewebes
AFP	alpha Fetoprotein
AML	akute myeloische Leukämie
aP2	<i>adipocyte Protein 2</i>
APS	Ammonium Peroxid Sulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
CCl₄	Tetrachlormethan
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDE	<i>choline deficient diet with ethionin</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CK	<i>cytokeratin</i> / Zytokeratin
CML	chronische myeloische Leukämie
COL1α2	<i>collagen type 1α2</i> / Kollagen 1 α 2
CYP7A1	Cholesterol 7 α Hydroxylase / Cytochrom P450 7A1
DDC	Diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-3,5-dicarboxylat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DAPI	4',6-Diamidin-3-phenylindol
DTT	Dithiothreitol
EGF	<i>epidermal growth factor</i> / epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

EpCAM	<i>epithelial cell adhesion molecule</i> / epitheliales Zelladhäsionsmolekül
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
FABP4	<i>fatty acid binding protein 4</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> / fetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> / Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i> / Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
FLT3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
FOXA3	<i>forkhead box protein A3</i>
FOXF1	<i>forkhead box protein F1</i>
FOXO1	<i>forkhead box protein O1</i>
GAP	<i>GTPase-activating-protein</i> / GTPase aktivierendes Protein
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> / saures Gliafaserprotein
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren
GRB2	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i> / Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HNF4α	<i>hepatocyte nuclear factor 4 alpha</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> / Meerrettich Peroxidase
HSC	<i>hepatic stellate cell</i> / hepatische Sternzellen
IL-6	Interleukin 6
iMSC	<i>induced mesenchymal stem cell</i> / induzierte mesenchymale Stammzelle
ITS+3	<i>insulin-transferrin-sodium selenite, linoleic, oleic-BSA</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LGR5	<i>leucin-rich repeat containing G protein coupled receptor 5</i>
LPC	<i>liver progenitor cell</i> / Leberprogenitorzelle
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
miRNA	micro Ribonukleinsäure
MRP2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i> / mesenchymale Stammzelle
NG2	<i>neural/glia antigen 2</i>
NTCP	<i>sodium taurocholate cotransporting polypeptide</i>
PAA	<i>poly acrylic acid</i> / Polyacrylsäure
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFRα	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha</i>
PDGFRβ	<i>platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PHX	partielle Hepatektomie
PI3K	<i>phosphoinositol 3 kinase</i> / Phosphoinositid-3-Kinase
PKB	Proteinkinase B
PLCγ	Phospholipase C γ
POD	Peroxidase
PSM	Penicillin/Streptomycin/Antimykotikum
qPCR	Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> / Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH2	<i>src homolog 2</i>
SOS1	<i>son of sevenless homolog 1</i>
STAT	<i>signal transducer of and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline, 0,2 % Tween-20</i>
TEMED	Tetraethylethylendiamin
TGFα	<i>transforming growth factor α</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNFα	<i>tumor necrosis factor α</i> / Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUDC	Tauroursodeoxycholsäure
VEGF	<i>vascular epithelial growth factor</i>
αSMA	<i>alpha smooth muscle actin</i>

Inhaltsverzeichnis

Einleitung.....	1
Hepatische Sternzellen	1
Leberregeneration der gesunden Leber	3
Leberregeneration der vorgeschädigten Leber.....	5
Leberregenerationsmodelle.....	7
Mesenchymale Stammzellen und Perizyten.....	9
Hepatische Sternzellen als mesenchymale Stammzellen und ihre Differenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen	11
Expression von PDGFR α , PDGFR β und ihrer Liganden während der Leberregeneration nach PHX und PHX/2AAF im Rattenmodell.....	13
Der PDGFR β -Signalweg	15
PDGFR β -Signalkaskaden und Differenzierungsvorgänge	18
Ziele der Arbeit	20
Material und Methoden	21
Material	21
Chemikalien.....	21
Verbrauchsmaterialien.....	21
Antikörper	22
Primer.....	23
Lösungen.....	25
Zelllinien	26
Methoden	27
Leberschädigungsmodelle	27
Zellisolierung	27
Zellkultur.....	29
Zellkultur zur Differenzierung.....	29
Probengewinnung.....	30

Probenaufreinigung und RNA-/Protein-Extraktion	30
Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qPCR)	31
Western Blot	32
Proliferationsmessung	34
Mikroskopie	36
Statistische Analyse.....	37
Ergebnisse.....	38
Nachweis der PDGF-Rezeptoren sowie deren Liganden während der Leberregeneration.....	38
Charakterisierung des Expressionsmusters kultivierter hepatischer Sternzellen.....	40
Nachweis mesenchymaler Stammzellmarker in kultivierten hepatischen Sternzellen	42
Nachweis der PDGF-Rezeptoren in hepatischen Sternzellen <i>in vivo</i> sowie <i>in vitro</i>	43
Proliferation von hepatischen Sternzellen unter Stimulation und Inhibition des PDGFR β -Signalwegs.....	47
Lichtmikroskopische Untersuchung hepatischer Sternzellen unter Crenolanib	51
Induktion von Progenitorzell- sowie Hepatozytenmarkern unter Crenolanib	53
Einfluss der Konzentration von Crenolanib auf die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen.....	54
Nachweis von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib mittels Immunfluoreszenz.....	55
Veränderung von Markern ruhender und aktivierter hepatischer Sternzellen unter Crenolanib.....	59
Nachweis von osteozytären, adipozytären und pankreatischen Markern in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib	60
Analyse der Akt-, ERK1/2- und p38-vermittelten Signalwege unter Crenolanib	62
Phosphorylierung der MAPK p38 unter Crenolanib	65
Einfluss der Phosphorylierung der MAPK p38 auf die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib	67
Veränderung autokriner und parakriner Wachstumsfaktoren sowie ihrer Rezeptoren in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib	70

Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib.....	72
Nachweis von Progenitorzellmarkern in der Zelllinie WB-F344.....	76
Nachweis von Hepatozytenmarkern in Zellen der Linie WB-F344 unter Crenolanib ..	77
Diskussion	79
Bedeutung der PDGFR-Signalwege für hepatische Sternzellen	79
Bedeutung der PDGFR-Signalwege für die Leberregeneration	88
Literaturverzeichnis.....	91

Einleitung

Hepatische Sternzellen

Hepatische Sternzellen wurden erstmals im Jahr 1876 als leberresidente Zellen von Kupffer et al. beschrieben¹. Hepatische Sternzellen sind spindelförmige Zellen mit prominenten, dendritischen Zellfortsätzen im Disse'schen Raum zwischen Hepatozyten und Sinusendothelzellen und stehen damit in engem, räumlichen Kontakt zu beiden Zelltypen^{2,3}. Die Zellpopulation der Sternzellen stellt etwa 7-8 % der Gesamtzellpopulation der Leber dar^{4,5}. In Ruhe zeichnen sich hepatische Sternzellen durch Membran-umhüllte Lipidvesikel aus, in denen Retinoide (Vitamin A) hauptsächlich als Retinylpalmitat gespeichert werden⁶⁻¹⁰. Die Leber enthält etwa 50 – 80% der Retinoide des Organismus¹¹. Der Großteil der Retinoide, etwa 80 – 90%, wird dabei in Sternzellen gespeichert, was eine herausragende Rolle dieser Zelle im Vitamin A-Metabolismus vermuten lässt⁷⁻⁹. Da Vitamin A eine flüchtige Eigenfluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht zeigt, kann dieses Verfahren zum Nachweis von Sternzellen der Leber verwendet werden^{1,12,13}.

Die embryonale Herkunft der hepatischen Sternzellen und ihre Abstammung aus einem bestimmten Keimblatt ist nicht abschließend geklärt¹⁴. *Lineage-Tracing-Assays* deuten darauf hin, dass hepatische Sternzellen mesenchymaler Herkunft sind und aus dem subendothelialen Raum des *Septum transversum* abstammen^{15,16}. Zudem exprimieren hepatische Sternzellen, besonders im aktivierten Zustand, die mesenchymalen Intermediärfilamentproteine Desmin und Vimentin sowie das aus kontraktile Zellen bekannte α SMA (*α smooth muscle actin*)¹⁷⁻¹⁹. Allerdings exprimieren HSCs auch die neuronalen Filamente GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) und Nestin, was auf eine neuroektodermale Herkunft aus der Neuralleiste hindeutet^{20,21}.

Sternzellen konnten auch in anderen Organen nachgewiesen werden. Insbesondere die pankreatische Sternzelle ist der hepatischen Sternzelle sehr ähnlich und es wird angenommen, dass beide Zelltypen einen gemeinsamen Ursprung haben^{22,23}. Aber auch in Lunge, Niere und Darm konnten Vitamin A speichernde Zellen nachgewiesen werden, die allerdings deutlich weniger erforscht sind als hepatische Sternzellen^{24,25}.

In den letzten Jahrzehnten fokussierte sich die Forschung an hepatischen Sternzellen besonders auf ihre Rolle in der Genese der Leberfibrose, da sie als Hauptproduzenten abgelagerter Kollagenmatrix während chronischer Schädigungsprozesse in der Leber identifiziert wurden²⁶. Durch chronische Schädigung der Leber kommt es zu einer

Aktivierung von hepatischen Sternzellen und deren Umwandlung zu einem Myofibroblasten-ähnlichen Phänotyp mit vermehrter Produktion extrazellulärer Matrixproteine^{27,28}. Diese Aktivierung hepatischer Sternzellen mit vermehrter Kollagen I-Produktion konnte ebenfalls *in vitro* bei Kultivierung auf Plastikoberflächen beobachtet werden²⁹. Dieser Befund erlaubt es, die Kultivierung von hepatischen Sternzellen auf Plastik als Modell für die Aktivierung von hepatischen Sternzellen bei chronischer Leberschädigung zu verwenden. Die Aktivierung hepatischer Sternzellen geht sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einem Verlust der gespeicherten Retinoide sowie einer zunehmenden Expression von α SMA einher^{19,28,30,31}. Stimuli für die Aktivierung hepatischer Sternzellen stammen *in vivo* von geschädigten Hepatozyten, Endothelzellen und Kupfferzellen^{32,33}. Entscheidende Merkmale des Phänotyps aktivierter hepatischer Sternzellen sind Proliferation, Kontraktilität, Fibrogenese, Degradation und Produktion extrazellulärer Matrix, Zytokinproduktion und Chemotaxis von Leukozyten; Prozesse die ebenfalls Teil der physiologischen Wundheilung der Leber sind³². Leberfibrose und nachfolgende Leberzirrhose hingegen sind Ergebnis einer anhaltenden, überschießenden Wundheilung durch eine chronische Schädigung der Leber³⁴.

Die Rolle hepatischer Sternzellen in der gesunden Leber blieb hingegen lange im Unklaren und ist auch heute noch in weiten Teilen ungeklärt³⁵. In den vergangenen Jahren führten jedoch neuere Studien zu einem differenzierteren Blick auf weitere Funktionen hepatischer Sternzellen abseits ihrer Rolle in der Fibrogenese. So konnte gezeigt werden, dass Sternzellen an der Immunregulation der Leber entscheidend beteiligt sind^{35,36}. Zudem wurde nachgewiesen, dass Desmin-positive hepatische Sternzellen in der embryonalen Leber eng assoziiert mit hämatopoetischen Stammzellen vorkommen und hepatische Sternzellen *in vitro*, nach dem Vorbild von MSCs des Knochenmarks, die Hämatopoese unterstützen^{37,38}.

Während der Leberschädigung und -regeneration konnte neben den beschriebenen schädigenden Prozessen auch ein protektiver Effekt hepatischer Sternzellen nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass aktivierte hepatische Sternzellen unter anderem durch die Produktion von HGF das hepatozelluläre Wachstum nach Leberschädigung unterstützen³⁹. Mäuse, die eine heterozygote Deletion des Transkriptionsfaktors FOXF1 (*forkhead box protein F1*) aufwiesen, zeigten im Leberschädigungsmodell mit Tetrachlormethan (CCl₄) eine gestörte Aktivierung hepatischer Sternzellen und erstaunlicherweise ebenfalls einen stärkeren und prolongierten Leberschaden sowie eine Störung der epithelialen Regeneration^{35,40}. Neueste Untersuchungen konnten darüber hinaus zeigen, dass hepatische Sternzellen Charakteristika von mesenchymalen Stammzellen besitzen und durch Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Gallensalzen zu

Hepatozyten-ähnlichen Zellen differenzieren können^{37,41,42}. Dies wird in den nachfolgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben.

Leberregeneration der gesunden Leber

Die Leber ist ein Organ mit sehr hoher Regenerationskapazität, die einzigartig im menschlichen Organismus ist. Unter physiologischen Bedingungen zeichnet sich die Leber durch eine geringe Proliferationsrate der Parenchym- und Nicht-Parenchymzellen aus⁴³. Nach einer Schädigung des Lebergewebes kommt es jedoch zu einer starken Steigerung der Proliferationsrate aller Zellen⁴³. Die Regeneration des geschädigten epithelialen Leberparenchyms erfolgt unter normalen Bedingungen durch vermehrte Zellteilung der verbliebenen, vitalen Hepatozyten⁴³. Die quantitativ größte DNA-Synthese in den verbliebenen Hepatozyten konnte bei Ratten 24 Stunden nach Schädigung beobachtet werden, während andere Leberzellen (Gallengangsepithelzellen, Endothelzellen, Kupferzellen und Sternzellen) erst 2 Tage nach Schädigung eine deutlich gesteigerte DNA-Synthese zeigen⁴⁴. An der Leberregeneration nimmt der Großteil der nicht vorgeschädigten Hepatozyten durch Proliferation teil⁴³. Experimentell konnte an Ratten gezeigt werden, dass bis zu 95% der Hepatozyten in jungen Tieren und bis zu 75% der Hepatozyten in sehr alten Tieren nach Schädigung der Leber proliferieren⁴⁵. Die hepatozytäre Proliferation wird dabei von den Nicht-Parenchymzellen wie Sternzellen, Sinusendothelzellen und Kupferzellen durch Sekretion von Wachstumsstoffen unterstützt⁴⁶. Die Proliferation gesunder Zellen während der Regeneration beginnt in der Umgebung der Portalfelder und schreitet im Modellorganismus der Ratte über einen Zeitraum von etwa 72 Stunden in Richtung der Zentralvenen fort⁴⁴. Etwa 3 bis 4 Tage nach Schädigung entstehen so Aggregate kleiner Hepatozyten um neugebildete Blutgefäße in der regenerierenden Leber, die schrittweise zu normaler Leberarchitektur mit fenestriertem Sinusendothel und Disse'schen Raum umgebaut werden⁴³. Die Ausgangsgröße der Leber, gemessen am Verhältnis des Lebergewichts zum Körpergewicht, ist bei der Ratte in der Regel 4 Wochen nach Schädigung wieder erreicht⁴⁷. Dabei werden während des Prozesses der Leberregeneration weiterhin wichtige Aufgaben der Homöostase wie Glukoseregulation, Produktion von Albumin sowie Gerinnungsfaktoren, Gallesekretion und Biotransformation körperfremder Stoffe vom verbliebenen Parenchym übernommen⁴³.

Zu Beginn der Leberregeneration kommt es zu einer schnellen Genregulation mit einer veränderten Expression von mehr als 100 verschiedenen *immediate-early* Genen⁴⁸⁻⁵⁰. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Leberregeneration durch zirkulierende, humorale Faktoren initiiert und aufrechterhalten wird⁵¹. Für die Initiierung sowie Aufrechterhaltung der Leberregeneration spielen die Wachstumsfaktoren und Interleukine HGF, EGF

(*epidermal growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*), IL-6 (Interleukin 6), TNF α (Tumornekrosefaktor α), besonders in der Funktion als Mitogene eine entscheidende Rolle^{43,52}. Dabei sind vor allem HGF und der zugehörige Rezeptor c-Met essentiell für die Leberregeneration⁴³. HGF wirkt *in vitro* als Mitogen für Hepatozyten und wird nach experimenteller Schädigung der Leber etwa 20-fach stärker exprimiert^{53,54}. Der Peak der Expressionssteigerung von HGF zeigt sich bereits 12 Stunden nach Schädigung der Leber, weshalb vermutet wird, dass HGF ein wichtiger früher Stimulus der DNA-Synthese der Hepatozyten ist⁵⁵. Es konnte gezeigt werden, dass HGF sowohl in gesunder Leber als auch nach Schädigung in hepatischen Sternzellen exprimiert wird⁵⁶. Weitere wichtige Mediatoren für die Leberregeneration sind Norepinephrin, Insulin, Schilddrüsenhormone, Retinsäurederivate, Serotonin, VEGF (*vascular epithelial growth factor*) sowie FGF1 und 2^{43,57}. Letztendlich bewirken die verschiedenen Mediatoren und aktivierten Signalwege einen Wechsel der Zellzyklusphase von der G₀- zur G₁- und S-Phase in den verbliebenen Hepatozyten⁴³. Neben den genannten Wachstumsfaktoren sind weitere Faktoren an der Leberregeneration beteiligt. So fördern Gallensalze die Leberregeneration und können bei Wegfall die Regeneration verzögern^{58,59}. Auch der Blutfluss im Leberparenchym, der sich bei Verlust von Lebergewebe auf ein kleineres Lebervolumen verteilt und dadurch höhere Flussgeschwindigkeiten erreicht, unterstützt die Leberregeneration⁴³. Das angeborene Immunsystem spielt insbesondere für die Koordination aber auch für die Einleitung der Regenerationsvorgänge eine Rolle⁴⁶.

Für die Wiederausbildung der komplexen Leberarchitektur sind Umbauvorgänge nach und während der Proliferation der Hepatozyten erforderlich. Dieser auch als *Resinusoidalization* bezeichnete Vorgang umfasst die Ausbildung des fenestrierten Endothels, des Disse'schen Raums sowie die kontrollierte Synthese der perisinusoidalen extrazellulären Matrix⁶⁰. An den Umbauvorgängen und der Produktion extrazellulärer Matrix sind vermutlich auch einwandernde und proliferierende hepatische Sternzellen beteiligt⁶⁰.

Nach dem Erreichen einer kritischen Lebergröße relativ zum Körpergewicht des Organismus kommt es zu einem Stopp der Proliferations- und Umbauvorgänge⁴³. Die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig bekannt, aber es wird vermutet, dass TGF β (*transforming growth factor β*) sowie Activin A an der Termination beteiligt sind^{43,60}. Dabei konnte gezeigt werden, dass TGF β und Activin A durch Inhibition der Proliferation und Steigerung der Apoptose von Hepatozyten das Organvolumen der Leber kontrollieren⁶⁰. TGF β und Activin A werden von hepatischen Sternzellen gebildet und sezerniert^{61,62}. Experimentell konnte gezeigt werden, dass die Leber auch nach wiederholter Schädigung zur Regeneration fähig ist, was ein nahezu unbegrenztes Regenerationspotential bei gesundem Leberrestgewebe vermuten lässt^{43,63}.

Leberregeneration der vorgeschädigten Leber

Während die Regeneration der normalen Leber bereits umfassend untersucht wurde, sind die Regenerationsvorgänge in der durch chronische Noxen vorgeschädigten Leber mit einer beeinträchtigten Proliferation der Hepatozyten in weiten Teilen noch unbekannt⁵². Die Diskrepanz zwischen der Regeneration normaler und chronisch vorgeschädigter Leber wird in verschiedenen Beobachtungen deutlich. So zeigte sich sowohl im Tierexperiment an Ratten als auch an Patienten mit einer Steatosis hepatis eine verzögerte und eingeschränkte Leberregeneration^{64,65}. Ebenso eingeschränkt ist die Regenerationsfähigkeit in der zirrhotischen Leber^{66,67}.

Während bei gesundem Leberrestgewebe davon ausgegangen wird, dass die Leberregeneration, wie bereits beschrieben, durch Proliferation reifer Hepatozyten erfolgt, entstand im Rahmen chronischer Leberschäden und dadurch bedingter eingeschränkter Proliferationsfähigkeit der Hepatozyten das Konzept der Beteiligung von Leberprogenitorzellen (LPCs) an der Regeneration⁶⁸⁻⁷⁰. Einige Autoren postulierten, dass es sich bei LPCs um sogenannte fakultative Stammzellen der Leber handelt, die bei ausgedehnten Leberschäden und Einschränkung der Hepatozytenproliferation hervortreten, stark proliferieren und in die epithelialen Zelltypen der Leber, Hepatozyten und Cholangiozyten, differenzieren können^{71,72}. Das Korrelat humaner LPCs wird in Nagern als Ovalzelle bezeichnet⁷³. Diese Progenitorzellen wurden von Solt und Farber im Zusammenhang mit der Untersuchung der Tumorgenese lebereigener Tumoren erstmals beschrieben und aufgrund ihrer ovalen Zellmorphologie als Ovalzelle benannt⁷⁴. Im Verlauf konnten Ovalzellen auch in tierexperimentellen Leberschädigungsmodellen mit stark eingeschränkter Hepatozytenproliferation beobachtet werden (PHX/2AAF bei der Ratte; DDC-Diät, CDE-Diät bei der Maus, Metronidazol beim Zebrafisch)⁷¹. Die verschiedenen Leberschädigungsmodelle werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben. Auch beim Menschen konnten in der geschädigten Leber wie beispielsweise im Rahmen chronischer Virushepatitis, alkoholtoxischer Leberschädigung und nicht-alkoholischer Steatohepatitis proliferierende LPCs mit Differenzierungspotential zu Hepatozyten und Cholangiozyten nachgewiesen werden^{73,75,76}.

Ovalzellen der Nager und analog LPCs beim Menschen zeigen eine Expression biliärer Marker⁷¹⁻⁷³. Die Oberflächenmarker EpCAM (*epithelial cell adhesion molecule*), CK19 (Zytokeratin 19), CD13 (*cluster of differentiation*), CD133 und AFP (alpha Fetoprotein) wurden als charakteristische Marker von LPCs identifiziert⁷⁷⁻⁸¹. Auch LGR5 (*leucine-rich repeat containing G protein coupled receptor 5*), ein Marker intestinaler Stammzellen, wird als Marker von LPCs diskutiert^{72,82}. Anhand ihrer Oberflächenmarker konnten LPCs aus

der Leber isoliert und *in vitro* untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass LPCs 1. ein klonales Wachstum zeigen, 2. unter Zugabe spezifischer Differenzierungsmedien zu Hepatozyten und Cholangiozyten differenzieren und 3. unter bestimmten Bedingungen nach Transplantation zu einer Repopulation geschädigten Lebergewebes führen und somit wichtige Kriterien einer Stammzelle erfüllen ⁷². Erstaunlicherweise konnten diese Eigenschaften auch bei Cholangiozyten, die aus gesunder Leber anhand analoger Oberflächenmarker isoliert wurden, nachgewiesen werden ⁷². Weiterhin kontrovers ist allerdings die Frage, ob LPCs auch *in vivo* zu Cholangiozyten und Hepatozyten differenzieren können und wie groß ihr Einfluss auf die Leberregeneration ist ^{71,72}.

Ebenfalls ungeklärt ist die Herkunft der LPCs ^{71,72}. Viele Autoren gehen von einem cholangiozytären Ursprung der LPCs aus ^{83–85}. Ebenso wird allerdings eine Abstammung aus Hepatozyten diskutiert ⁸⁶. Kordes et al. zeigten, dass LPCs auch aus Sternzellen der Leber hervorgehen können ⁴¹. Neben der genauen Identifizierung der Abstammung von LPCs ist zudem unklar, ob alle Zellen dieser bisher nicht eindeutig identifizierten Zellpopulation als Pool für LPCs dienen oder nur eine definierte Subpopulation ⁷². Als potentielle Stammzellnische der LPCs werden die Hering'schen Kanäle im Bereich der Portalfelder diskutiert, die das Verbindungsstück zwischen den interlobären Gallengängen mit einem Epithel aus Cholangiozyten und den von Hepatozyten begrenzten *Canaliculi biliferi* bilden ^{72,87}. Durch histologische Untersuchungen an der Ratte konnte gezeigt werden, dass proliferierende Ovalzellen nach 2AAF-Behandlung besonders im Bereich der Portalfelder zu finden sind und sich über die sogenannte dukuläre Reaktion von den Hering'schen Kanälen in Richtung der Zentralvene ausbreiten ⁸⁸. Die dukuläre Reaktion wurde dabei näher beschrieben, als gangähnliche Struktur, bestehend aus proliferierenden Ovalzellen und einer umgebenden, durchgängigen Basalmembran, die nur von ebenfalls proliferierenden hepatischen Sternzellen durchbrochen wird ⁸⁸. Der kausale Beweis der Abstammung von LPCs aus den Hering'schen Kanälen fehlt jedoch bisher ⁷².

Eine ähnliche Hypothese zur Neubildung von Hepatozyten im Bereich der Portalfelder wurde 1985 von Zajicek et al. mit dem Modell der „strömenden“ Leber formuliert ⁸⁹. Die Autoren gingen davon aus, dass die Leberregeneration und auch der normale Gewebsumsatz von proliferierenden Hepatozyten im Bereich des Portalfelds ausgehen, die schrittweise entlang der Sinusoide in Richtung der Zentralvene wandern und dabei einen Differenzierungsprozess durchlaufen, um die differentiellen Stoffwechselaktivitäten in verschiedenen Bereichen des Leberparenchyms zu übernehmen ^{72,89}.

Als wichtige Signalwege und Signaltransduktoren für die Regulation von LPCs konnten die Signalwege Wnt, Notch und FGF identifiziert werden ^{72,90}. Es konnte zudem gezeigt werden,

dass HGF und EGF sowie die zugehörigen Rezeptoren c-Met und EGFR wichtig für die Proliferation und Differenzierung von LPCs sind^{91,92}. Zudem wird vermutet, dass FGF7 ein wichtiger Nischenfaktor von LPCs ist und an deren *de novo* Aktivierung nach Schädigung der Leber beteiligt ist⁹⁰. Ebenfalls konnten HGF, FGF1 und TGF α als wichtige Wachstumsfaktoren für die Aktivierung und frühe Proliferation von LPCs identifiziert werden⁹³. Zudem exprimieren LPCs FGFR1 und FGFR2, die Rezeptoren von FGF1 und FGF2, was eine Beteiligung der Wachstumsfaktoren an der Regulation dieser Zellen vermuten lässt⁹⁴.

Zwar gibt es einige Hinweise für die Beteiligung von Leberprogenitorzellen an der Regeneration stark geschädigter Leber in Nagern, ob diese allerdings als Leberstammzellen im eigentlichen Sinne analog zu Stammzellen anderer Organe zu betrachten sind und wie groß der Einfluss von LPCs auf die Leberregeneration tatsächlich ist, wird weiterhin sehr kontrovers diskutiert^{52,71,72}.

Leberregenerationsmodelle

Der Großteil der Pathophysiologie der Leberregeneration wurde an Tiermodellen der Ratte und Maus untersucht⁵². Dabei können grundsätzlich zwei verschiedene Schädigungsprinzipien unterschieden werden: die Schädigung des Lebergewebes durch chirurgische Eingriffe und die Schädigung durch toxische Chemikalien⁹⁵.

Eines der bekanntesten und bestuntersuchten Modelle der Leberschädigung ist die partielle Hepatektomie (PHX), die erstmals 1931 durch Higgins und Anderson eingesetzt wurde⁴⁷. Die Autoren entfernten durch Resektion des mittleren und des linken lateralen Leberlappens etwa 70% der Leber der Ratte⁴⁷. Diese, auch als 2/3 Hepatektomie bezeichnete Methode, wird von den Tieren gut toleriert, zeigt eine hohe Reliabilität und ist ein wichtiges Modell für die Regeneration der normalen, nicht vorgeschädigten Leber^{43,52}. Die Methode kann durch zusätzlich Entfernung des rechten Leberlappens auf eine 90% Hepatektomie ausgeweitet werden⁹⁵. Hier zeigt sich eine verringerte Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere, sowie eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit, weshalb sie auch zur Untersuchung des fulminanten Leberversagens eingesetzt wird^{52,96}. Weitere chirurgische Schädigungsmodelle umfassen die Portalvenenokklusion sowie portosystemische Shunts⁹⁵.

Um die Mechanismen der Leberregeneration unter der Bedingung vorgeschädigter Hepatozyten, die in ihrer Proliferation eingeschränkt sind, zu untersuchen, wurde ein weiteres Tiermodell an der Ratte etabliert, bei dem die Proliferation der Hepatozyten durch Vorbehandlung mit 2-Acetaminofluoren (2AAF) blockiert wird⁵². Diese Technik wurde

ursprünglich zur Untersuchung der Hepatokarzinogenese von Solt und Farber entwickelt⁷⁴. Es konnte gezeigt werden, dass Hepatozyten durch 2AAF-Behandlung den Marker p21 vermehrt exprimieren, seneszent werden und die Progression von der G₀ Phase in die G₁/S-Phase blockiert wird⁹⁷. Wird nach Behandlung mit 2AAF chirurgisch (PHX) oder chemisch (CCl₄) ein Regenerationsreiz induziert, kann etwa 5 – 6 Tage nach Schädigung das Auftreten von kleinen, schnell proliferierenden Vorläuferzellen, die gangähnliche Strukturen (duktuläre Reaktion) bilden, in den Periportalfeldern beobachtet werden^{71,98,99}. Diese Zellen entsprechen den im oberen Abschnitt beschriebenen Ovalzellen. Es wird angenommen, dass Ovalzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu Hepatozyten differenzieren können und somit an der Regeneration bei Vorschädigung der Leber beteiligt sind^{100–102}. Diese Hypothese ist allerdings noch immer umstritten, denn beispielsweise Dusabienza et al. beobachteten, dass der Großteil der Regeneration unter Behandlung mit 2AAF durch Proliferation weniger, nicht proliferationsgehemmter Hepatozyten erfolgt und nur zu einem sehr viel kleineren Anteil durch die Proliferation und Differenzierung von Ovalzellen¹⁰³.

Zur Klärung dieser Kontroverse sind weitere Experimente mit transgenen Tieren und *lineage-tracing* von Hepatozyten und Ovalzellen während der Leberregenerationsprozesse notwendig⁵². Diese Methodik ist allerdings im Gegensatz zum Mausmodell in der Ratte wenig angewandt und etabliert¹⁰⁴. Das PHX/2AAF Modell hingegen kann nicht auf die Maus übertragen werden, da 2AAF, aufgrund fehlender Umwandlung in den aktiven Metaboliten im Organismus der Maus, die Hepatozytenproliferation nicht ausreichend blockiert¹⁰⁵. Eine Schädigung der Leber der Maus durch eine Diät mit DDC (Diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethylpyridin-3,5-dicarboxylat) führt ähnlich wie eine Cholin-defiziente Diät mit Ethionin (CDE) oder eine Diät mit hoher Dosis an Galaktosamin mit Polysacchariden ebenfalls zu einem Auftreten von Ovalzellen^{71,106,107}. In diesen Modellen konnte allerdings in zahlreichen Experimenten keine wesentliche Differenzierung der Ovalzellen zu Hepatozyten oder Cholangiozyten gezeigt werden^{71,108–110}. Diese Diskrepanz zwischen Ratten- und Mausmodellen mit ihrer unterschiedlichen Schädigungsqualität und -dynamik konnte bisher nicht aufgelöst werden. Raven, Lu und Forbes et al. untersuchten zwei neue Mausmodelle der Leberregeneration, bei denen die Regenerationsfähigkeit der Hepatozyten dauerhaft und vollständig inhibiert wurde¹¹¹. Zum einen durch Knockout des β 1-Integrin Gens und darauf folgender Nekrose der Hepatozyten und zum anderen durch Überexpression des p21-Gens und einem dadurch bedingten Wachstumsstopp durch Inhibition des Wachstumsfaktor-*signalling*¹¹¹. Die Autoren konnten zeigen, dass diese definitive Inhibition der Regeneration durch Hepatozytenproliferation eine Voraussetzung für die Differenzierung von LPCs zu Hepatozyten ist¹¹¹.

Somit konnte gezeigt werden, dass das Auftreten sowie die Proliferation und Differenzierung von LPCs vom gewählten Leberregenerationsmodell abhängig sind. Möglicherweise besteht mit den neuen Schädigungsmodellen ein neuer Ansatz, die Diskrepanz zwischen Maus- und Rattenmodellen aufzulösen.

Trotz zahlreicher Erkenntnisse, die durch die verschiedenen Tiermodelle über die zeitliche Abfolge, die beteiligten Zelltypen, Faktoren, Signalwege und die Genregulation der Leberregeneration gewonnen wurden, zeigen die verwendeten Modelle auch Schwächen, vor allem in ihrer Vergleichbarkeit mit chronischen Leberschädigungen des Menschen sowie bei ihrer Übertragbarkeit auf die klinische Anwendung⁵². Insbesondere liegt dies an der Diskrepanz, dass Tierschädigungsmodelle meist auf einer alleinigen und konstant einheitlichen Form des Schadens basieren, welcher eher einen milden und kurzen Verlauf aufweist, während chronische Lebererkrankungen des Menschen multifaktoriell über einen langen Zeitraum entstehen und in ihrer Ausprägung sehr unterschiedlich sind⁵².

Mesenchymale Stammzellen und Perizyten

Mesenchymale Stammzellen sind eine heterogene Gruppe somatischer, multipotenter Stammzellen mit ungeklärter Herkunft, die erstmals im Knochenmark beschrieben wurden¹¹². Zu Beginn wurden MSCs als nicht-hämatopoetische Stammzellen identifiziert, die adhären auf Plastik anwachsen, in Kultur Kolonien identischer Klone, abstammend aus einer Einzelzelle, bilden und unter bestimmten Bedingungen zu Osteoblasten und Stromazellen des Knochenmarks differenzieren können¹¹²⁻¹¹⁴. Im Verlauf konnte gezeigt werden, dass es sich bei MSCs um multipotente Stammzellen handelt, die neben Osteoblasten zu weiteren mesenchymalen Zelltypen wie Adipozyten und Chondrozyten differenzieren können¹¹⁵. Zudem konnten MSCs nicht nur im Knochenmark, sondern ubiquitär in allen adulten Geweben und Organen nachgewiesen werden¹¹⁶.

Nach jahrelanger unklarer Definition dieser Zellgruppe mit einem teilweise heterogenen Expressionsmuster wurde eine einheitliche Definition für MSCs von der International Society of Cellular Therapy verabschiedet¹¹⁷. Danach definieren sich humane MSCs 1. durch adhärenthes Wachstum auf Plastik in Kultur, 2. durch den Nachweis der Marker CD105, CD73, CD90 in Abwesenheit der Marker CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 und HLA-DR und 3. durch ihr Differenzierungspotential in die drei Zelllinien der Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten¹¹⁷. Für murine MSCs wurde eine ähnliche Definition bei Nachweis der zusätzlichen Marker CD106 und Sca1 beschlossen¹¹⁸. Als weitere wichtige Marker zur Identifizierung von MSCs wurden die beiden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen PDGFR α und β identifiziert¹¹⁹⁻¹²¹.

Der perivaskuläre Raum wird in verschiedenen Organen als Stammzellnische der MSCs diskutiert^{122,123}. Ebenso wurde die Hypothese formuliert, dass Perizyten das *in vivo*-Korrelat der hauptsächlich *ex vivo* erforschten MSCs darstellen¹²³. Perizyten wurden erstmals von Charles Rouget als „*non-pigmented adventitial cells*“ beschrieben, die Endothelzellen umgeben und zahlreiche, feine Zellausläufer aufweisen¹²⁴. Später wurden diese Zellen, die in zahlreichen Organen Teil der Wandbegrenzung kleiner Gefäße und Kapillaren sind, einheitlich als Perizyten benannt und charakterisiert¹²⁵. Dabei konnte gezeigt werden, dass aus Skelettmuskel, Pankreas, Fettgewebe, Plazenta und weiteren Organen gewonnene Perizyten einheitliche Marker exprimieren und sich in der Zellkultur zu einer MSC-ähnlichen Zellpopulation mit Differenzierungspotential in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten entwickeln¹²³. Ebenso konnten die MSC-Marker CD44, CD73, CD90 und CD105 bei allen untersuchten Perizyten nachgewiesen werden¹²³.

Neben ihren Differenzierungseigenschaften zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten konnte gezeigt werden, dass MSCs unter bestimmten Kulturbedingungen auch zu Zellen epithelialer Herkunft differenzieren können¹²⁶. So konnten sowohl humane MSCs als auch isolierte MSCs aus Nagern *in vitro* und *in vivo* zu Hepatozyten differenzieren. Die Differenzierung von MSCs zeigte sich durch ein typisches hepatozytäres Expressionsmuster, eine epitheliale Zellmorphologie sowie durch funktionale Eigenschaften von Hepatozyten wie die Bildung und Sekretion von Albumin und Harnstoff, die Aufnahme von LDL (*low density lipoprotein*) und die Speicherung von Glykogen^{127–131}. Eine Differenzierung isolierter MSCs *in vitro* wurde insbesondere durch die Behandlung mit den Wachstumsfaktoren HGF und FGF4 erreicht^{129,131}.

MSCs sind als gut verfügbare, adulte und multipotente Stammzellen zunehmend in den Fokus der regenerativen Medizin geraten^{126,132}. So zeigten Studien, dass Zellen des Knochenmarks an der Regeneration zahlreicher Gewebe wie Skelettmuskulatur, Herz, Leber, Haut und Gefäßendothelien beteiligt sind^{133–137}. Es wird vermutet, dass MSCs durch verschiedene Mechanismen an diesen Regenerationsprozessen beteiligt sind: durch Produktion und Sezernierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Immunmodulation und Differenzierung in Parenchymzellen^{126,132}.

Hepatische Sternzellen als mesenchymale Stammzellen und ihre Differenzierung zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen

Kordes et al. konnten zeigen, dass hepatische Sternzellen die MSC-Marker CD29, CD73, CD105, CD146, PDGFR β und NG2 (*neural/glia antigen 2*) entweder bereits direkt nach Isolierung oder im Verlauf der Kultivierung exprimieren³⁷. Bereits zuvor wurde gezeigt, dass hepatische Sternzellen die stammzellassoziierten Marker Nestin, CD105, p75 Neurotrophin Rezeptor und c-kit Ligand exprimieren^{21,138–140}. Kordes et al. zeigten zudem, dass Sternzellen zu Adipozyten und Osteozyten differenzieren können sowie in Ko-Kulturexperimenten den Erhalt und die Blutbildung hämatopoetischer Stammzellen unterstützen³⁷. Aufgrund der Expression typischer MSC-Marker, ihrem Differenzierungspotential und der funktionalen Unterstützung der Hämatopoese schlossen die Autoren, dass es sich bei hepatischen Sternzellen um leberresidente mesenchymale Stammzellen handelt^{37,141}. Da es sich bei Sternzellen um Perizyten der Leber handelt, passt diese Hypothese ebenfalls zu der Annahme, dass Perizyten das *in vivo*-Korrelat von MSCs darstellen^{123,142}. Es wird zudem angenommen, dass MSCs an der Fibrogenese in zahlreichen Organen während chronischer Schädigung beteiligt sind, weshalb die Rolle der hepatischen Sternzelle bei der Entstehung der Leberfibrose nicht widersprüchlich zur These des MSC-Charakters von hepatischen Sternzellen ist¹⁴³. Für Zellen der humanen HSC-Zelllinie LX-2 konnte ebenfalls ein MSC-Markerprofil sowie ein Differenzierungspotential von MSCs nachgewiesen werden¹⁴⁴. Die Sternzelle des Pankreas, die, wie bereits beschrieben, sehr eng mit der Sternzelle der Leber verwandt ist, zeigt ebenfalls eine Expression typischer MSC- und Stammzellmarker¹⁴⁵.

In weiteren Experimenten konnten Kordes et al. zeigen, dass hepatische Sternzellen *in vitro* durch Behandlung mit den Wachstumsfaktoren HGF und FGF4, aber auch durch die Stimulation mit geringen Konzentrationen an Gallensalzen, insbesondere Tauroursodeoxycholsäure (TUDC), zu einem Hepatozyten-ähnlichen Zellphänotyp differenzieren können^{41,42} (**Abb. 1**). Der Hepatozyten-ähnliche Phänotyp wurde durch den Nachweis der Expression der Marker CYP7A1 (Cholesterol 7 α Hydroxylase), HNF4 α (*hepatocyte nuclear factor 4 α*), Albumin, BSEP (*bile salt export pump*), NTCP (*sodium taurocholate-cotransporting polypeptide*), MRP2 (*multidrug resistance protein 2*) und CK18 (Zytokeratin 18) gezeigt sowie durch den Nachweis der Synthese und Sekretion von Albumin und Gallensalzen. Im Verlauf der 21-tägigen Differenzierung zeigten hepatische Sternzellen vorübergehend ein Expressionsmuster ähnlich dem der LPCs/Ovalzellen mit Expression von CK19, EpCAM, LGR5 und AFP⁴¹. Aufgrund dieser Beobachtung vermuten die Autoren, dass es sich bei hepatischen Sternzellen um eine eigenständige Quelle von

Progenitorzellen handelt, die durch Differenzierungsprozesse Parenchymzellen der Leber bilden können ⁴¹.

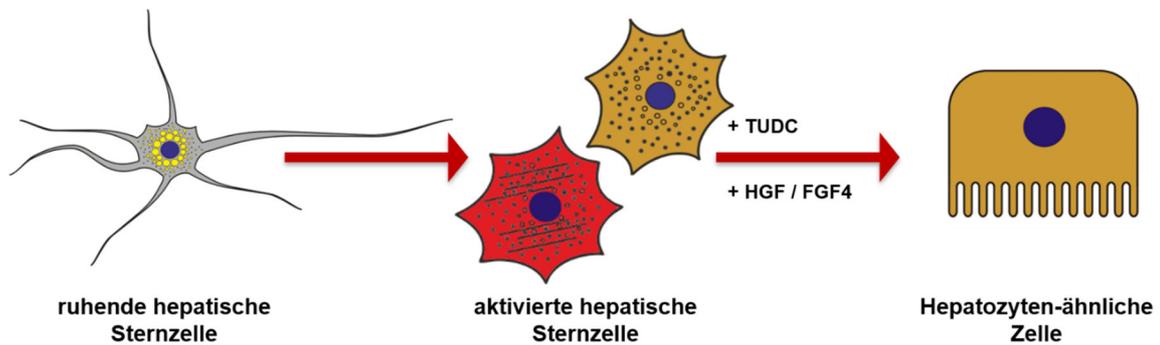


Abbildung 1: Differenzierung von hepatischen Sternzellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen. Hepatische Sternzellen sind residente Zellen der Leber, die im Disse'schen Raum angesiedelt sind. Im ruhenden Zustand speichern sie große Mengen Vitamin A in Lipidvakuolen. Durch eine Leberschädigung können hepatische Sternzellen aktivieren und einen Myofibroblasten-ähnlichen-Phänotyp entwickeln. Diese Form der aktivierten hepatischen Sternzellen kann durch Produktion großer Mengen extrazellulärer Matrix maßgeblich zur Entstehung von Leberfibrose und -zirrhose beitragen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass aktivierte Sternzellen nicht zwangsläufig diesem kollagenproduzierenden Phänotyp entsprechen. Durch Stimulation mit Gallensalzen wie Tauroursodeoxycholsäure (TUDC) oder der Wachstumsfaktoren HGF und FGF4 können hepatische Sternzellen differenzieren und einen Hepatozyten-ähnlichen-Phänotyp entwickeln.

In einer Transplantationsstudie konnte die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Häussinger zeigen, dass isolierte hepatische Sternzellen nach Transplantation in Ratten mit geschädigter Leber zum Ort der Leberregeneration migrieren und an der Regeneration des Lebergewebes durch Differenzierung zu den epithelialen Zelltypen Hepatozyten und Cholangiozyten beteiligt sind ⁴¹. Transplantierbarkeit, *homing* zum Ort der Gewebsschädigung, Proliferation und Differenzierung zu Parenchymzellen sind wichtige Charakteristika von Stammzellen ^{146–149}. Zudem konnte gezeigt werden, dass transplantierte hepatische Sternzellen sich zusätzlich im Knochenmark ansiedeln. Diese hepatischen Sternzellen konnten wieder isoliert sowie transplantiert werden und erneut an der Leberregeneration teilnehmen ⁴¹. Es konnte also gezeigt werden, dass hepatische Sternzellen wiederholt transplantierbar sind und damit eine weitere wichtige Eigenschaft von Stammzellen aufweisen ¹⁴⁹. Ebenso zeigten die Autoren, dass sich hepatische Sternzellen klonal vermehren können, also auch das Stammzellkriterium der Selbsterneuerung erfüllen ⁴¹.

In Verbindung mit dem Konzept der hepatischen Sternzelle als mesenchymaler Stammzelle der Leber wurde der Disse'sche Raum als Stammzellnische der Sternzelle diskutiert ^{87,150}. Das Prinzip der Stammzellnische wurde erstmals im Zusammenhang mit hämatopoetischen Stammzellen beschrieben und als Raum angesehen, in dem Stammzellen durch angrenzende Zellen über lösliche Faktoren und Zell-Zell-Interaktionen

in einem undifferenzierten Zustand erhalten werden und eine Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung erhalten wird ^{150,151}. Es konnte gezeigt werden, dass der Disse'sche Raum, aufgebaut aus den angrenzenden Parenchymzellen, den Sinusendothelzellen, den extrazellulären Basallaminaproteinen Kollagen IV und Laminin sowie einer sympathischen Innervierung, Struktur und Funktion einer Stammzellnische aufweist ⁸⁷. Durch die Sekretion löslicher Faktoren durch Sinusendothelzellen und Parenchymzellen können hepatische Sternzellen im Disse'schen Raum in einem ruhenden Zustand gehalten, sowie ihre Migration und Proliferation inhibiert werden ⁸⁷.

Obwohl einige Evidenz dafür spricht, dass es sich bei hepatischen Sternzellen um MSCs der Leber handelt, die an der Leberregeneration durch Differenzierung zu epithelialen Zellen beteiligt sind und damit eine potentielle Quelle von LPCs darstellen, wird diese Hypothese kontrovers diskutiert. So konnten einzelne Arbeitsgruppen durch *lineage-tracing* Analysen Beweise für eine Differenzierung von hepatischen Sternzellen zu epithelialen Zellen finden ¹⁵²⁻¹⁵⁴, andere hingegen dem Konzept der hepatischen Sternzellen als Progenitorzelle der Leber widersprechen ^{155,156}.

Expression von PDGFR α , PDGFR β und ihrer Liganden während der Leberregeneration nach PHX und PHX/2AAF im Rattenmodell

In bisher unveröffentlichten Analysen der regenerierenden Leber von Ratten unter Verwendung zweier Schädigungsmodelle der Leber, PHX und PHX/2AAF, konnte die Arbeitsgruppe von Herrn Professor Dr. Häussinger einen auffälligen Anstieg der mRNA-Expression des PDGFR β während der stammzellbasierten Leberregeneration (PHX/2AAF) feststellen. Die mRNA-Expression des PDGFR α zeigte hingegen keinen signifikanten Anstieg während der stammzellbasierten Leberregeneration (**Abb. 2**).

In der PHX-Kohorte, als Modell der normalen Leberregeneration, konnten sowohl für den PDGFR β als auch für den PDGFR α im Beobachtungszeitraum der Regeneration keine signifikanten Änderungen der mRNA-Expression im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden (**Abb. 2**).

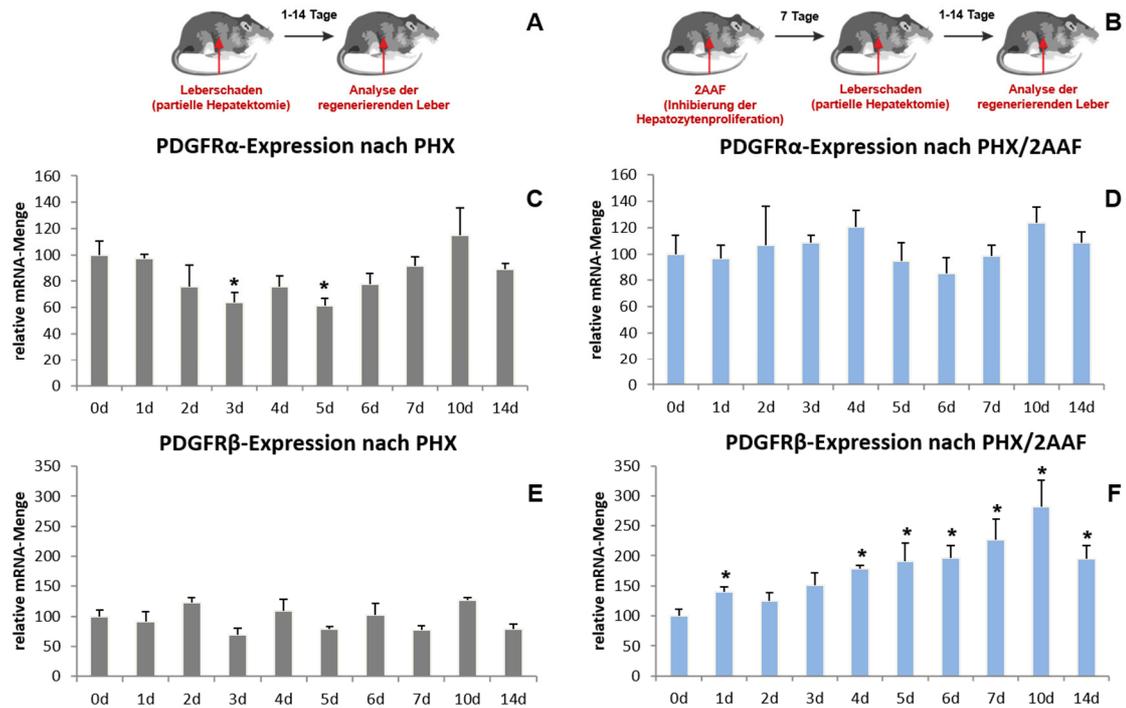


Abbildung 2: Vergleich der mRNA-Expression der PDGF-Rezeptoren während der Leberregeneration in zwei verschiedenen Regenerationsmodellen. Die Hepatozytenproliferation, die einen Tag nach einer chirurgische Entfernung von 70% der Leber einsetzt (Modell: PHX, links, **A**) wurde während der stammzellbasierten Regeneration (Modell: PHX/2AAF, rechts, **B**) 7 Tage vor dem Eingriff durch 2AAF, welches subkutan als Wirkstoffpellet appliziert wurde, inhibiert. Das subkutane Pellet setzte über 14 Tage hinweg kontinuierlich etwa 5 mg 2AAF pro Tag frei. Die Experimente wurden durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen genehmigt (Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.163). Während der stammzellbasierten Leberregeneration (PHX/2AAF) zeigte sich im Verlauf von 14 Tagen eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression des PDGFR β im Vergleich zum Tag 0 (Kontrolle) mittels qPCR. Dabei wurde der maximale Anstieg der mRNA-Expression des PDGFR β an Tag 10 der Leberregeneration beobachtet (**F**). Ein signifikanter Anstieg des PDGFR β unter Leberregeneration nach alleiniger PHX als Modell für eine normale Leberregeneration konnte nicht festgestellt werden (**E**). Die mRNA-Expression des PDGFR α zeigte keine signifikanten Änderungen im Vergleich zum Kontrollwert in beiden Leberregenerationsmodellen (**C**, **D**). (Auswertungen wurden durchgeführt von Frau Dr. Silke Götze; die Versuche wurden durchgeführt von Herrn. Dr. Claus Kordes und Frau Dr. Iris Sawitza; Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Düsseldorf; n=3-5; Signifikanz wurde angenommen bei $p < 0,05$.)

Analog zu der mRNA-Expression des PDGFR β konnte während der stammzellbasierten Leberregeneration auch ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression der Liganden, PDGF-BB und PDGF-DD, beobachtet werden. Dieser Anstieg konnte bei der normalen Leberregeneration nach PHX nicht beobachtet werden (**Abb. 3**).

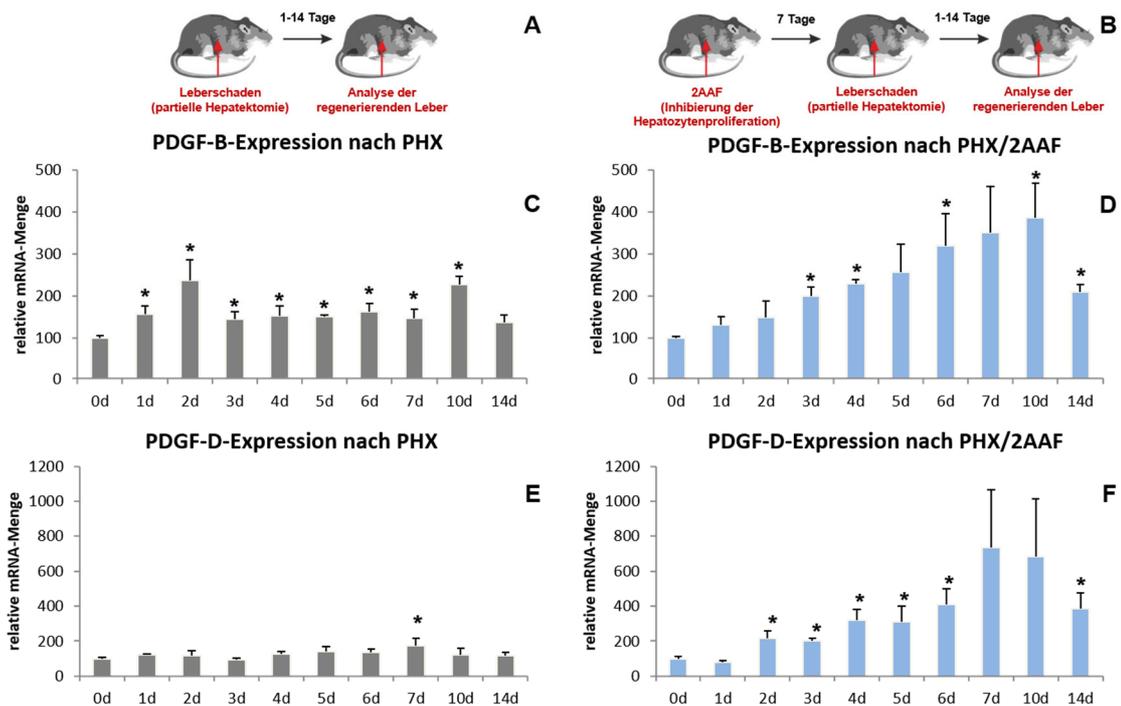


Abbildung 3: Vergleich der mRNA-Expression der PDGF-Rezeptor-Liganden PDGF-B und PDGF-D in zwei verschiedenen Leberregenerationsmodellen. Die Hepatozytenproliferation, die einen Tag nach einer chirurgische Entfernung von 70% der Leber einsetzt (Modell: PHX, links, **A**) wurde während der stammzellbasierten Regeneration (Modell: PHX/2AAF, rechts, **B**) 7 Tage vor dem Eingriff durch 2AAF, welches subkutan als Wirkstoffpellet appliziert wurde, inhibiert. Das subkutane Pellet setzte über 14 Tage hinweg kontinuierlich etwa 5 mg 2AAF pro Tag frei. Die Experimente wurden durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen genehmigt (Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.163). Während der stammzellbasierten Leberregeneration (PHX/2AAF) zeigte sich im Verlauf von 14 Tagen eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der PDGFR-Liganden B und D im Vergleich zum Tag 0 (Kontrolle) mittels qPCR (**D**, **F**). Ein signifikanter Anstieg der beiden Liganden während der Leberregeneration nach alleiniger PHX konnte nicht festgestellt werden (**C**, **E**). (Auswertungen wurden durchgeführt von Frau Dr. Silke Götze; die Versuche wurden durchgeführt von Herrn. Dr. Claus Kordes und Frau Dr. Iris Sawitza; Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Düsseldorf; n=3-5; Signifikanz wurde angenommen bei $p < 0,05$.)

Die Beobachtung der gesteigerten mRNA-Expression des PDGFR β und seiner Liganden während des Schädigungsmodells PHX/2AAF lässt eine wichtige Funktion der PDGFR β -vermittelten Signalwege für die stammzellbasierte Regeneration der Leber vermuten.

Der PDGFR β -Signalweg

Der PDGF-Komplex umfasst eine Gruppe von Wachstumsfaktoren aus den vier Polypeptidketten A, B, C und D, die durch Disulfidbrücken zu den Homodimeren AA, BB, CC und DD sowie zu Heterodimeren zusammengelagert werden¹⁵⁷. Die Synthese und anschließende Speicherung in Granula von PDGF wurde zuerst in Megakaryozyten und Thrombozyten nachgewiesen, woraus sich der Name dieser Gruppe von Wachstumsfaktoren ableitet¹⁵⁸. Später konnte die Synthese von PDGF auch in zahlreichen weiteren Zelltypen, unter anderem Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen und glatten

Muskelzellen der Gefäßwände nachgewiesen werden ¹⁵⁹. Alle Dimere des PDGF werden zunächst als Vorläuferproteine gebildet und anschließend durch Proteolyse in ihre aktive Form umgewandelt ¹⁵⁷. Aktivierte PDGF-Liganden binden an die zwei Rezeptoren PDGFR α und PDGFR β , die sich nach Bindung eines Liganden ebenfalls zu Homo- oder Heterodimeren zusammenlagern ¹⁵⁷. Dabei zeigen die verschiedenen Dimere des PDGF unterschiedliche Affinitäten zu beiden Rezeptoren ¹⁵⁷. Während die PDGF-Dimere AA, AB und CC an PDGFR α -Homodimere binden, zeigen die PDGF-Dimere BB und DD eine höhere Affinität zu PDGFR β -Homodimeren ¹⁶⁰. An PDGFR α / β -Heterodimere hingegen binden die Liganden PDGF-AB, -BB, -CC und -DD ¹⁶⁰. Bei den PDGF Rezeptoren α und β handelt es sich um 170 kDa und 180 kDa große, membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die sich aus einer extrazellulären Domäne, bestehend aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne zusammensetzen ^{159,161}. Die Bindung der Liganden erfolgt an die Immunglobulin-ähnlichen Domänen 2 und 3 und führt, vermittelt über die Immunglobulin-ähnliche Domäne 4, zu einer stabilen Dimerisierung zweier Rezeptorketten ^{157,162}. Die Dimerisierung führt durch Konformationsänderungen der intrazellulären Domäne zu einer Aktivierung der *active site* der Kinasesubdomäne und nachfolgend zu einer trans-Autophosphorylierung der beiden Rezeptorketten ¹⁵⁷. Dabei verfügt die PDGFR β -Kette über insgesamt 11 identifizierte Autophosphorylierungsstellen ¹⁶³. Die Autophosphorylierung von Tyrosinresten der PDGF-Rezeptorketten führt zu einer Steigerung der enzymatischen Aktivität der Kinasesubdomäne sowie zur Entstehung von Bindestellen für Signalmoleküle mit SH2 (*src homology 2*)-Domänen ^{157,164}. Bei SH2-Domänen handelt es sich um Sequenzen von etwa 100 Aminosäurenresten, die spezifisch phosphorylierte Tyrosinreste und deren benachbarte Strukturen erkennen und binden ¹⁶⁵. Es konnten 10 verschiedene Proteinfamilien mit SH2-Domänen identifiziert werden, die an aktivierte PDGF-Rezeptoren binden ¹⁵⁷. Dabei werden Signalmoleküle mit eigener intrinsischer enzymatischer Aktivität von Signalmolekülen, die keine eigene enzymatische Aktivität besitzen und als Adaptermoleküle für weitere Signaltransduktoren dienen, unterschieden ¹⁵⁷. Zu den Signalmolekülen mit eigener intrinsischer Aktivität, die an der PDGFR-Signalkaskade beteiligt sind, zählen die Tyrosin-Kinasen der SRC-Familie, die SHP-2 Tyrosin-Phosphatasen, das GTPase aktivierende Protein (GAP) für Ras (*rat sarcoma*) und die Phospholipase C γ (PLC γ) ¹⁵⁷. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Signaltransduktoren und -aktivatoren STATs (*signal transducers and activators of transcription*) durch SH2-Domänen aktiviert werden und als Transkriptionsfaktoren in den Nucleus translozieren ¹⁵⁷. Signalmoleküle ohne intrinsische enzymatische Aktivität sind GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*), das als Adaptermolekül für SOS1 (*son of sevenless homolog 1*) fungiert und über Ras eine Aktivierung der MAPK, ERK und p38

bewirkt ¹⁵⁷. Ebenfalls zu diesen Signalmolekülen zählt die regulatorische Untereinheit p85 der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die durch Interaktion mit der Untereinheit p110 zu einer Aktivierung der PI3K führt ¹⁵⁷.

Unmittelbare zytoplasmatische Effekte der PDGFR-Signaltransduktion sind ein Ca²⁺-Einstrom sowie pH-Veränderungen und im weiteren zeitlichen Verlauf Veränderungen des Zytoskeletts mit Ausbildung von Zellmembranfortsätzen ¹⁶¹. Langfristig bewirkt eine Aktivierung des PDGFR-Signalwegs eine Steigerung der Proliferation, der Migration und des Überlebens der Zelle ¹⁵⁷. Die Signalwege, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, sind in **Abbildung 4** dargestellt.

Da eine Überexpression von PDGF im Gewebe zur Tumorentstehung und -aufrechterhaltung beiträgt, wurde das PDGF-Rezeptor-*signalling* in zahlreichen klinischen Studien inhibiert ^{157,166}. Als potenter Inhibitor der PDGF-Rezeptoren wurde dabei das *small molecule* Imatinib identifiziert, ein 2-Phenylaminopyrimidin-Derivat, das durch kompetitive Blockierung der ATP-Bindungsstelle die Tyrosin-Kinaseaktivität inhibiert. Allerdings inhibiert Imatinib nicht spezifisch den PDGFR, sondern zudem zusätzlich den Stammzellrezeptor kit, Abl1 (*abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) und raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*)-Kinasen ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. Imatinib wird klinisch zur Therapie der chronisch myeloischen Leukämie (CML) sowie metastasierter gastrointestinaler Stromatumoren (GIST) verwendet ¹⁶⁹. Crenolanib, ein Benzimidazol-Derivat, ist ein oral bioverfügbarer, gut verträglicher Inhibitor des PDGFR α und β , der spezifischer und mit höherer Affinität für diese Signalwege wirkt als Imatinib ¹⁷⁰. Eine weitere Besonderheit von Crenolanib ist die höhere Affinität zu phosphorylierten, also aktivierten Tyrosin-Kinasen, was Crenolanib zu einem sogenannten Typ I Tyrosin-Kinaseinhibitor macht ¹⁷¹. Crenolanib wurde in einer Phase I und einer Phase Ib klinischen Studie für den Einsatz bei soliden Tumoren erfolgreich getestet ^{170,172} und befindet sich momentan in Phase II klinischen Studien zur Therapie bei adulten und pädiatrischen Gliomen, akuter myeloischer Leukämie (AML) und GIST ¹⁷³⁻¹⁷⁷. Allerdings konnte auch für Crenolanib eine Kreuzreaktivität mit FLT3 (*FMS-like tyrosine kinase 3*) beobachtet werden ^{178,179}.

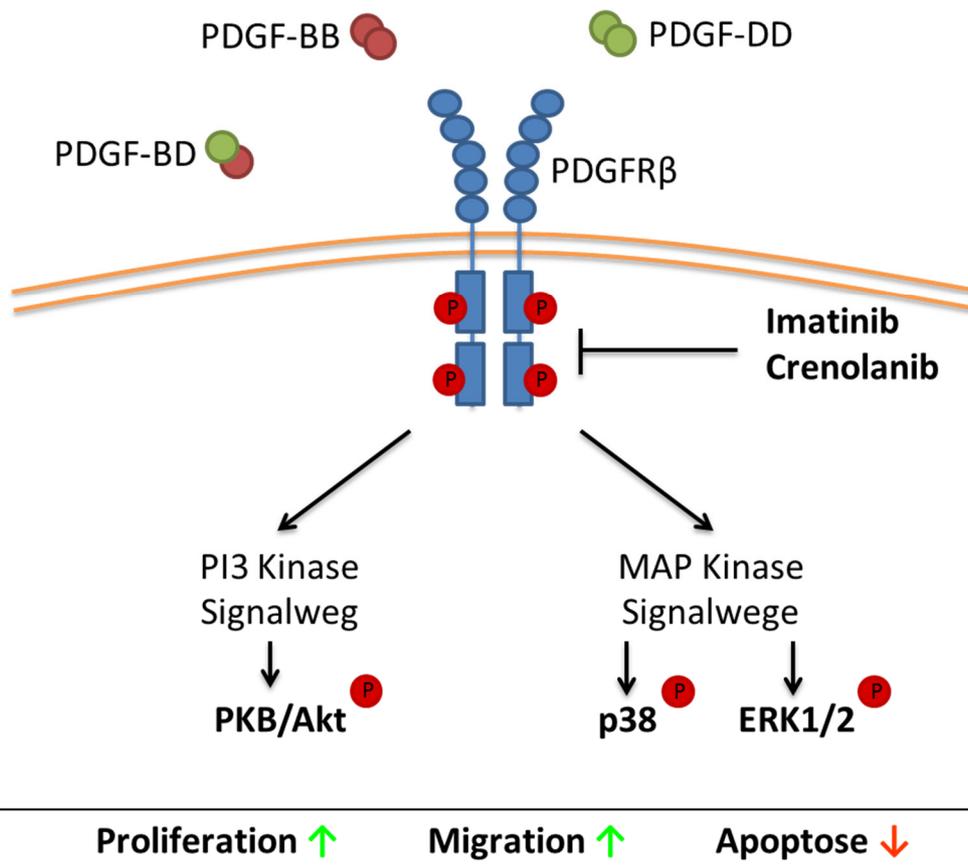


Abbildung 4: PDGF-Rezeptor- β -Signalkaskade. Die Liganden B und D des PDGFR β können als Homodimere BB bzw. DD oder als Heterodimer BD an den PDGFR β binden. Die intrazelluläre Domäne des membranständigen PDGFR β fungiert als Tyrosin-Kinase und wird nach Bindung der Liganden autophosphoryliert. Durch die Phosphorylierung werden weitere Signalmoleküle aktiviert, die unter anderem zu einer Aktivierung der PI3K-Signalwegs sowie des MAPK-Signalwegs führen. Im Zuge dieser Aktivierung werden die Proteinkinase B (PKB/Akt), sowie die MAPK p38 und ERK 1/2 phosphoryliert. Für Zellen mesenchymalen Ursprungs wurde bereits gezeigt, dass eine Aktivierung des PDGFR β -Signalwegs eine Steigerung der Proliferation und Migration sowie eine Inhibition der Apoptose bewirkt (nach Heldin et al., Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment, *Cell Commun. Signal.*, 2013).

PDGFR β -Signalkaskaden und Differenzierungsvorgänge

Die Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie sowie das PDGFR-*signalling* spielen sowohl in der Embryogenese als auch in der Homöostase und Wundheilung des adulten Organismus eine wichtige Rolle ¹⁵⁹. Allerdings ist eine vermehrte Aktivierung der PDGFR-Signalwege auch an pathologischen Vorgängen wie Tumorentstehung und -progress, Atherosklerose und der Fibrogenese in verschiedenen Organen, unter anderem der Leber, beteiligt ¹⁵⁹. So konnte gezeigt werden, dass sowohl die Liganden als auch die Rezeptoren des PDGF während der Fibrogenese der Leber vermehrt exprimiert werden ¹⁸⁰. Es zeigte sich, dass PDGF ein potenter Wachstumsfaktor für hepatische Sternzellen ist und die Proliferation aktivierter hepatischer Sternzellen im Rahmen einer Leberfibrose fördert ^{181–183}. Nach partieller Hepatektomie an Mäusen konnte ebenfalls eine verstärkte Expression des

PDGFR β und bei Deletion des Rezeptors eine prolongierte Leberschädigung beobachtet werden, was im Gegensatz zur Beteiligung an der Leberfibrose auch auf einen positiven Einfluss von PDGFR β -vermittelten Signalwegen während der Leberregeneration hinweist¹⁸⁴.

Besonders für die Funktion von MSCs und weiteren Zellen mesenchymalen Ursprungs ist das PDGFR-*signalling* essentiell für Proliferation, Wachstum, Überleben und Migration^{159,160}. Neben diesen Funktionen konnte ein Einfluss des PDGFR-*signalling* auch auf verschiedene Differenzierungsvorgänge von MSCs gezeigt werden. Generell zeigte sich dabei eine Inhibierung verschiedener Differenzierungsvorgänge von MSCs nach Stimulation der PDGF-Rezeptoren. So wurde festgestellt, dass Stimulation mit PDGF, insbesondere PDGF-BB, die Differenzierung von ADSC (*adipose-derived stem cells*) zu Adipozyten inhibiert^{185,186}. Diese Inhibition der Differenzierung zeigte sich an einer verringerten Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und Adipozytenmarkern wie Adiponektin, aP2 (*adipocyte Protein 2*) und Fettsäuresynthase sowie einer verminderten Anfärbung von Lipiden in der Oil-red-Färbung^{185,186}. ADSC sind aus dem Fettgewebe gewonnene Stammzellen, die in Kultur analog zu MSCs des Knochenmarks ein osteogenes, myogenes, chondrogenes sowie adipozytäres Differenzierungspotential zeigen und somit eine Alternative zu MSCs aus dem Knochenmark darstellen¹⁸⁷. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mastzellen über PDGFR-Signalwege die Differenzierung von MSCs aus dem Knochenmark zu Myozyten inhibieren, allerdings gleichzeitig die Migration und Proliferation steigern¹⁸⁸. Stimulation mit PDGF-BB konnte zudem die *in vitro*-Differenzierung von MSCs des Knochenmarks zu Osteozyten inhibieren, was sich an einer verminderten Expression der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase und einer verringerten Synthese von mineralisierter Knochenmatrix zeigte¹⁸⁹.

Ziele der Arbeit

Grundlage der vorliegenden Untersuchungen war der Befund, dass es sich bei hepatischen Sternzellen um MSCs der Leber handelt, die ein großes Entwicklungspotential besitzen. Ferner war bekannt, dass die PDGFR-vermittelten Signalwege wichtig für die Steuerung der Proliferation, Migration und Entwicklung von MSCs sind. Bisher wurden PDGFR-vermittelte Signalwege in hepatischen Sternzellen ausschließlich im Hinblick auf ihre Proliferations- und Migrations-steigernde Wirkung untersucht. Es fehlen aber Untersuchungen zur Klärung der Frage, ob der PDGFR-Signalweg einen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten von hepatischen Sternzellen hat.

Die Leberschädigungsmodelle an der Ratte ließen einen besonderen Einfluss des PDGFR β auf die stammzellbasierte Regeneration der Leber und von hepatischen Sternzellen in ihrer Rolle als MSC in diesem Prozess vermuten.

Basierend auf diesen Beobachtungen war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss der PDGFR-Signalwege auf hepatische Sternzellen im Hinblick auf ihr Differenzierungsverhalten *in vitro* zu untersuchen.

Material und Methoden

Material

Chemikalien

Für die Versuche wurden Chemikalien der Firmen Merck, AppliChem, ROTH, GE Healthcare, Gibco, BIO RAD und Sigma-Aldrich verwendet. Die Chemikalien, die für die Versuche von besonderer Bedeutung waren, wie Zellkulturmedien, Wachstumsfaktoren und *small molecules* zur Inhibition verschiedener Signalwege, finden sich in folgender Tabelle.

Tabelle 1: Materialien für die Kultur und Behandlung von Zellen

Name	Firma	Katalognummer
Crenolanib	Selleckchem	S2730
DAPI with Fluoromount G	SouthernBiotech	0100-20
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max®	Sigma-Aldrich	D2650
Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich	D6429
Fibroblast Growth Factor 15 (FGF15), murin	Prospec	cyt-027-b
Fibroblast Growth Factor 7 (FGF7, KGF), human	PeptoTech	100-19
Fibroblast Growth Factor acidic (FGF1), human	Sigma-Aldrich	F5542
Hepatocyte Growth Factor (HGF), human	Peptotech	100-39
Imatinib	Selleckchem	S2475
Insulin-transferrin-sodium selenite, linoleic; oleic-BSA (ITS+3) Liquid Media Supplement (100x)	Sigma-Aldrich	I2771
Linoleic Acid-Oleic Acid-Albumin (100x)	Sigma-Aldrich	L9655
Platelet-Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB), rat	Sigma-Aldrich	P4056
Platelet-Derived Growth Factor-DD (PDGF-DD), human	R&D Systems	1159-SB
Precision Plus Protein™ All Blue Standards	BIORAD	161-0373
PSM (Penicillin/Streptomycin/Antimykotikum)	Gibco	A5955
SB203580 (p38 Inhibitor)	Cell Signaling	5633S

Verbrauchsmaterialien

Sterile Zellkulturplatten, Zellkulturschalen und Zellkulturflaschen wurden von Greiner bio-one erworben. Sterile und unsterile Pipetten und Pipettenspitzen wurden von Corning Incorporated und StarLab bezogen. Deckgläser und Objektträger zur Mikroskopie wurden von VWR, Engelbrecht Labortechnik und Marienfeld erworben.

Für die Versuche wurden des Weiteren folgende kommerziell erwerbliche Kits verwendet.

Tabelle 2: Materialien für molekularbiologische und biochemische Untersuchungen

Name	Firma	Katalognummer
Cell Proliferation ELISA, BrdU, Colorimetric	Roche	11647229001
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific	K0253
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific	K1632
RNeasy Isolation Kit	Qiagen	74106
Western Bright Chemilumineszenz Substrat Quantum	Biozym	541015
Western Bright Chemilumineszenz Substrat Sirius	Biozym	541021
Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare	RPN2106

Antikörper

Tabelle 3: Primärantikörper für biochemische und histologische Analysen

Name	Spezies	Firma	Katalognummer
42/44 MAPK (ERK 1/2)	rabbit	Millipore	06-182
Akt	rabbit	Cell Signaling	9272
CD44	mouse	Cell Signaling	5640S
CK18	mouse	Acris	BM2275P
CK19	mouse	Progen	65129
Desmin	mouse	Dako	00073088
Desmin XP	rabbit	Cell Signaling	5332S
EpCAM	rabbit	abcam	Ab32392
GFAP XP	rabbit	Cell Signaling	12389S
Nestin	mouse	Santa Cruz Biotechnology	H2207
p38	mouse	Cell Signaling	9228
PDGFR α	mouse	Santa Cruz Biotechnology	Sc-398206
PDGFR α	rabbit	Cell Signaling	3164
PDGFR β	rabbit	Cell Signaling	3169S
Phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	rabbit	Cell Signaling	9211S
Phospho Akt (Ser473)	rabbit	Cell Signaling	4058
Phospho-p42/44 MAPK (Thr202/Tyr204)	mouse	Cell Signaling	9106
Vimentin	mouse	Dako	20022872
α SMA	mouse	Sigma Aldrich	A2547
α SMA	mouse	Dako	00072869
γ -Tubulin	mouse	Sigma-Aldrich	T5326

Tabelle 4: Sekundärantikörper für biochemische und histologische Analysen

Name	Spezies	Firma	Katalognummer
Alexa Fluor 488, Anti-ms-IgG, FITC	goat	Invitrogen	A11034
Anti-ms-IgG, Cy3	donkey	Millipore	AP192C
Anti-ms-IgG, FITC	donkey	Millipore	AP192F
Anti-ms-IgG, HRP	donkey	Millipore	AP192P
Anti-rb-IgG, Cy3	donkey	Millipore	AP182C
Anti-rb-IgG, FITC	donkey	Millipore	AP182F
Anti-rb-IgG, HRP	donkey	Millipore	AP182P

Primer

Primer für die quantitative PCR wurden mittels der Software Primer3web Version 4.0.0. generiert und durch die Firma Eurofins Genomic, Ebersberg synthetisiert.

Tabelle 5: Primer für molekularbiologische Analysen

Name	Sequenz	Basenpaare bp	Accession Nummer
Activin A	Forward: TCTCAAATGCAGTGTCTTCCTGG	280	NM_017128.2
	Reverse: GGACCTAACTCTCAGCCAGAGATG		
AFP	Forward: ACCTGACAGGGGAAGATGGTG	155	NM_012493.2
	Reverse: GCAGTGGTTGATACCGGAGT		
Albumin	Forward: CTTCAAAGCCTGGGCAGTAG	221	NM_134326.2
	Reverse: GCACTGGCTTATCACAGCAA		
αSMA	Forward: GCACTACCATGTACCCAGGCA	102	NM_031004.2
	Reverse: TGCCTTCTGGAGGAGCAA		
α-Amylase	Forward: TGGGAGGACTGCTATTGTCC	119	NM_031502.1
	Reverse: TTTCATTGGGTGGAGAGACC		
BSEP	Forward: TACCAGGAAAAGCGTGTGTG	197	NM_031760.1
	Reverse: CCCAGTGATGACCCATAACC		
CK18	Forward: CAGAAGAACCCTGAGGAACTG	161	NM_053976.1
	Reverse: TTCATCGAGTCCAGGTCAATC		
CK19	Forward: CCTTCCGTGATTACAGCCAGT	147	NM_199498.2
	Reverse: CTGTCTCAAACCTTGGTCCGGA		
cMet	Forward: GCACCCCAAAGCTGGTAATA	477	NM_031517.2
	Reverse: GATCCGGTTGAACGATCACT		
COL1α2	Forward: ACCTCAGGGTGTTC AAGGTG	222	NM_053356.1
	Reverse: CGGATTCCAATAGGACCAGA		
Desmin	Forward: AGCCTGGGTG CAGAGACAGAA	155	NM_022531.1
	Reverse: TATCTCCTGCTCCACATCC		
EGF	Forward: CTGTGATTGAAATGGCCGATCT	164	NM_012842.1
	Reverse: CCTGTTTTGACCAGTCTCTTG		
EpCAM	Forward: TGCATACTGCACTTCAGGACA	195	NM_138541.1
	Reverse: GGAACAAGGACTCCCCCTTTA		
FABP4	Forward: TGGAAACTCGTCTCCAGTGAG	347	NM_053365.1
	Reverse: TCACGCCTTTCATGACACAT		

Fortsetzung Tabelle 5: Primer für molekularbiologische Analysen

Name	Sequenz	Basenpaare bp	Accession Nummer
FGF1	Forward: GGCCACTTCTTGAGGATTCTTC	165	NM_012846.1
	Reverse: GTATAAAAGCCCTTCGGTGTCC		
FGF2	Forward: GAACCGGTACCTGGCTATGA	182	NM_019305.2
	Reverse: CCGTTTTGGATCCGAGTTTA		
FGF7	Forward: CTGTGGCAGTTGGAATTGTGG	174	NM_022182.1
	Reverse: CGCTGTGTGCCATTTAGCTG		
FGF10	Forward: GTGAAATCGGAGTTGTTGCC	173	NM_012951.1
	Reverse: CCGTTGTGCTGCCAGTAAAA		
FGF15	Forward: TCCCTACGTCTCCAACCTGCT	228	NM_130753.1
	Reverse: CAGTCCATTTCTCCCTGAA		
FGFR2	Forward: CGAATACGCATCGAAAGGCAA	195	NM_001109896.1
	Reverse: GCTGCCAAGTCTCGATGGATA		
FGFR4	Forward: GCTATCTGCTGGATGTGCTG	169	NM_001109904.1
	Reverse: CTGCCGTTGATAACGATGTG		
FOXA3	Forward: CTCAGTGAAGATGGAGGCC	143	NM_017077.2
	Reverse: GGTAGGGAGAGCTAAGAGGGT		
HGF	Forward: CGAGCTATCGCGTAAAGAC	165	NM_017017.2
	Reverse: TGTAGCTTTCACCGTTGCAG		
HNF4 α	Forward: AAATGTGCAGGTGTTGACCA	178	NM_022180.2
	Reverse: CACGCTCCTCCTGAAGAATC		
HPRT1	Forward: AAGTGTGGATACAGGCCAGA	145	NM_012583.2
	Reverse: GGCTTTGACTTGGCTTTTCC		
Insulin	Forward: CTGCCAGGCTTTTGTCA	255	NM_019129.3
	Reverse: CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG		
Osteocalcin	Forward: AGACAAGTCCCACACAGCAAC	396	NM_013414.1
	Reverse: TGGAGAGTAGCCAAAGCTGAA		
PDGF-BB	Forward: TGGACTTGAACATGACCCGAG	167	NM_031524.1
	Reverse: ATTGGTGCGATCGATGAGGTT		
PDGF-DD	Forward: CTCAGGGAGGAGTTGAAGCTG	170	NM_023962.2
	Reverse: TGTCCAGGCTCAAACCTCAGT		
PDGFR α	Forward: TTCTGGAGCTTGTGGATGACC	166	NM_012802.1
	Reverse: ATATTGAGACGTTGCTGGCC		
PDGFR β	Forward: TCTACAACAACCTACTGGGGC	157	NM_031525.1
	Reverse: TCTGTCACTCGGCATGGAATC		
Vimentin	Forward: GAACGTAAAGTGAATCCTTGC	304	NM_031140.1
	Reverse: GTCTCCGGTATTCGTTTGACTC		

Lösungen

Tabelle 6: Zusammensetzung der Nycodenz-Lösung

	Substanz
287 g	Nycodenz
370 mg	KCl
210 mg	MgCl x 6H ₂ O
70 mg	MgSO ₄ x 7H ₂ O
150 mg	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
30 mg	KH ₂ PO ₄
1090 mg	Glukose x 2H ₂ O
227 mg	NaHCO ₃
ad 1000 ml	Aqua bidest, pH 7,3

Tabelle 7: Zusammensetzung des Puffers zur Lyse von Zellen (RL-Puffer)

	Substanz
20 mM	TRIS pH 7,4
140 mM	NaCl
10 mM	NaF
10 mM	Na-Pyrophosphat x 10 H ₂ O
1 %	Triton x-100
1 mM	EDTA pH 8
1 mM	EGTA pH 8
1 mM	Na ₃ VO ₄
20 mM	β-Glycerolphosphat
10 Tabletten	Complete Proteaseinhibitor
ad 500 ml	Aqua bidest

Tabelle 8: Zusammensetzung des Auftragspuffers für Western-Blot-Analysen

	Substanz
12 ml	10 % SDS-Lösung (m/V)
3 ml	1 M TRIS pH 6,8
3 ml	Aqua bidest
6 ml	Glycerin
4 ml	Bromphenolblau
7 ml	1 M DTT

Tabelle 9: Zusammensetzung des Gelelektrophoresepuffers 5x für Western-Blot-Analysen

	Substanz
25 g	SDS
470 g	Glycin
75,5 g	TRIS
ad 5000 ml	Aqua bidest

Tabelle 10: Zusammensetzung des Transferpuffers 10x für Western-Blot-Analysen

	Substanz
6 g	SDS
58 g	Glycin
116 g	TRIS
ad 2000 ml	Aqua bidest

Tabelle 11: Zusammensetzung der Stocklösungen von Crenolanib, Imatinib und SB203580

Stocklösungen von Crenolanib, Imatinib und SB203580
Stocklösung Imatinib: 10 mM (in DMSO)
Stocklösung Crenolanib: 10 mM (in DMSO)
Stocklösung SB203580: 10 mM (in DMSO)

Zelllinien

Für Untersuchungen an Ovalzellen wurde die aus Fischer-344 Ratten isolierte Zelllinie WB-F344 der JCRB Cell Bank, Osaka, Japan (Katalognummer JCRB0193) verwendet.

Methoden

Leberschädigungsmodelle

Es wurden die Leberschädigungsmodelle PHX und PHX/2AAF an männlichen Wistar HanRJ-WI Ratten durch Herrn Dr. Claus Kordes und Frau Dr. Iris Sawitza (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Düsseldorf) durchgeführt. Diese Versuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen genehmigt (Aktenzeichen 9.93.2.10.34.07.163).

Beim ersten Schädigungsmodell, der PHX, wurden die Tiere zunächst mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (5 mg/kg Körpergewicht) durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Nach Einsetzen der Narkose wurde die Haut und die Bauchmuskulatur eröffnet und der mittlere und linke, laterale Leberlappen (entspricht etwa 70% des ursprünglichen Lebervolumens) nach Ligatur der Gefäße nach dem Protokoll von Anderson & Higgins, 1931 entfernt⁴⁷. Direkt im Anschluss an die Operation wurde den Tieren zur Analgesie das Schmerzmittel Carprofen (5 mg/kg Körpergewicht) injiziert. Zur Analyse der Regeneration im Zeitverlauf wurde zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 und 14 Tage nach PHX die Leber der Tiere zur Analyse entnommen.

Beim zweiten Schädigungsmodell, PHX/2AAF, wurde die Hepatozytenproliferation während der Regeneration mittels vorheriger Applikation von 2AAF inhibiert. Den Ratten wurde hierzu 7 Tage vor geplanter partieller Hepatektomie 2AAF subkutan als Pellet implantiert. Nach Narkose mit Ketamin/Xylazin wurde hierzu ein kleiner Schnitt im Nackenbereich der Ratte gesetzt, ein Pellet mit 70 mg 2AAF unter der Haut platziert und anschließend der Hautschnitt wieder vernäht. Das subkutane Pellet setzte über 14 Tage hinweg kontinuierlich etwa 5 mg 2AAF pro Tag frei. 7 Tage nach Implantation des Pellets wurde eine partielle Hepatektomie, wie oben beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde auch hier zur Analyse der Regeneration im Zeitverlauf zu den Zeitpunkten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10 und 14 Tage nach PHX die Leber der Tiere zur Analyse entnommen.

Zellisolierung

Die Isolierung von Sternzellen aus der Ratten-Leber wurde entsprechend dem Protokoll von Hendriks et al.⁸ mittels Dichtegradientenzentrifugation durch Frau Claudia Rupprecht (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Düsseldorf) durchgeführt. Dieses Verfahren wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2012.A344).

Für die Zellisolierung wurden Ratten (Wistar HanRJ-WI) im Alter zwischen 12 und 15 Monaten mit einem Gewicht > 500 g verwendet. Hierzu wurden die Ratten zunächst mit Ketamin/Xylazin durch intraperitoneale Injektion narkotisiert. Zusätzlich wurde 0,5 ml Heparin i.v. zur Inhibition der Blutgerinnung appliziert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Leber durch Punktion der Portalvene für einige Minuten mit *Hank's balanced salt solution* (HBSS) perfundiert. Anschließend wurde die Leber mit angrenzender Pfortader entnommen und an ein Perfusionssystem angeschlossen. Mittels des Perfusionssystems wurde die Leber in verschiedenen Perfusionsschritten mit HBSS gespült, sowie mit 0,35% Pronase-Lösung und 0,028% Kollagenase-Lösung enzymatisch verdaut. Nach Erreichen einer ausreichenden Verdauung wurde die Leber vom Perfusionssystem getrennt und in ein steriles Glasgefäß mit 100 ml 0,1% Pronase-Lösung und 5 mg DNase (in 500 µl HBSS) gegeben. Anschließend wurde verbliebenes, leberfremdes Gewebe entfernt und die Leberkapsel zwischen zwei Pinzetten zerdrückt. Die dabei austretende Zellsuspension wurde anschließend durch schrittweise Filtration (Siebe mit einer Porengröße von 200 µm und 70 µm) von größeren Zellaggregaten befreit.

Das gewonnene Filtrat wurde für 3 Minuten bei 4 °C und 44 g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Hepatozyten abzutrennen. Der Überstand mit den Nicht-Parenchym-Zellen wurde abgenommen und für 10 Minuten bei 4 °C und 450 g zentrifugiert. Der Überstand mit enthaltenen Enzymen wurde verworfen und das Zellpellet auf vier Falcons mit je 29 ml HBSS verteilt. Die Zellen wurden durch Zugabe von 11 ml 28,7% Nycodenz-Lösung (**Tabelle 6**) zu jedem Falcon resuspendiert. In neuen Falcons wurden 8 ml HBSS mit 20 ml der Zellsuspension unterschichtet. Die Falcons wurden anschließend 20 Minuten bei 4 °C und 1400 g bei ausgestellter Zentrifugenbremse zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt diente dem Auftrennen der verschiedenen nicht-epithelialen Zelltypen der Leber in der Suspension. Die obere weißliche Phase mit den angereicherten hepatischen Sternzellen wurde vorsichtig abgenommen und in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) mit 10% FCS (*fetal calf serum*) aufgenommen. Anschließend wurde zur Reinigung der Zelllösung erneut für 5 Minuten bei 4 °C und 450 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in einem definierten Volumen von DMEM mit 1% Penicillin/Streptomycin/Antimykotikum (PSM) und 10% FCS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend auf Plastik-Gewebekulturplatten ausgebracht und kultiviert. Pro 6 cm-Zellkulturschale wurden 800.000 Zellen, pro 10 cm-Zellkulturschale wurden 3.000.000 Zellen, pro 12-Well-Platte 1.500.000 Zellen und pro 96-Well-Platte 1.000.000 Zellen ausgebracht.

Die Reinheit der isolierten hepatischen Sternzellen wurde 24 Stunden nach ihrer Isolierung durch Anregung mit UV-Licht (Wellenlänge 350 nm) lichtmikroskopisch beurteilt (**Abb. 5**).

In der Regel konnte durch das geschilderte Isolierungsverfahren eine Kulturreinheit von $\geq 98\%$ erzielt werden.

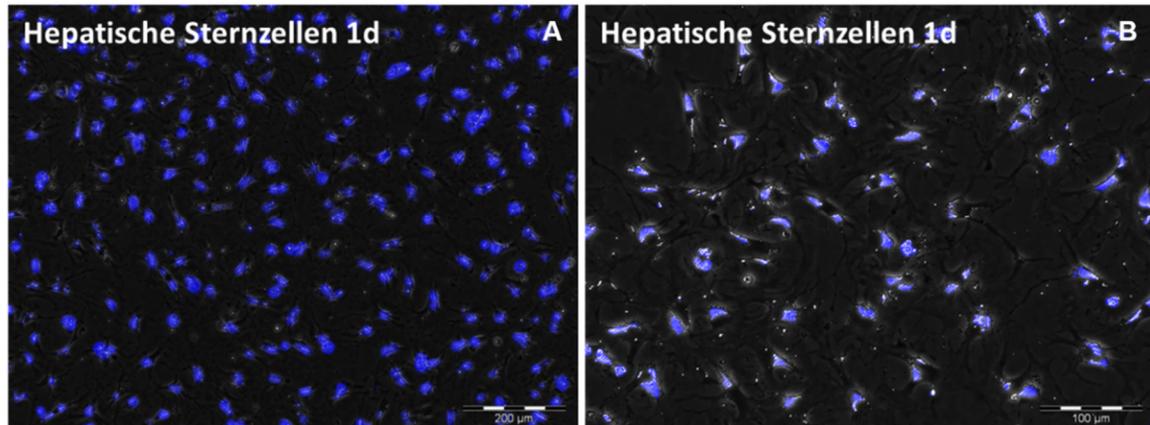


Abbildung 5: Eigenfluoreszenz von hepatischen Sternzellen zur Überprüfung der Kulturreinheit. **A, B** Hepatische Sternzellen wurden an Tag 1 (1d) nach Isolierung mit UV-Licht angeregt und die Eigenfluoreszenz der eingelagerten Retinoide dokumentiert. Aufgrund der charakteristischen Retinoid-Fluoreszenz hepatischer Sternzellen im Gegensatz zu anderen Zellen der Leber wie Hepatozyten und Endothelzellen konnte die Reinheit der Kultur beurteilt werden. Das Fluoreszenzsignal wurde mit einem Durchlichtbild kombiniert. **B** Stärkere Vergrößerung von frisch isolierten Sternzellen der Ratten-Leber.

Zellkultur

Die Zellen wurden nach ihrer Isolierung mit 3 ml (pro 6 cm-Zellkulturschale) bzw. 10 ml (pro 10 cm-Zellkulturschale) DMEM, versetzt mit 1% PSM und 10 % FCS, bei 37 °C, 5% CO₂ und etwa 21% O₂ kultiviert. Weitere Experimente wurden unter serumfreien Bedingungen durchgeführt, um mögliche Interaktionen von Wachstumsfaktoren des FCS zu minimieren. Hierzu wurden die Zellen in 3 ml bzw. 10 ml DMEM, versetzt mit 1% PSM und 1% des Serumersatzes Insulin-Transferrin-Sodium-Selenit (ITS), ergänzt durch 9,4 µg/ml Linolsäure, 9,4 µg/ml Ölsäure und 1 mg/ml Albumin, kultiviert.

Zellkultur zur Differenzierung

Die Zellen wurden an Tag 1 nach ihrer Isolierung von serumhaltigem auf serumfreies Kulturmedium umgestellt (DMEM, 1% PSM, 1% ITS + Linoleic Acid-Oleic Acid-Albumin). Der PDFGR-Inhibitor Crenolanib wurde in Stoffmengenkonzentrationen von 10 nM, 100 nM oder 1000 nM, gelöst in DMSO, dem Medium zugesetzt. Kontrollen wurden mit serumfreiem DMEM nur unter Zugabe des Lösungsmittels DMSO kultiviert. Die Zellen wurden jeweils mit 4 ml Medium inkubiert und das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Probengewinnung

Für die Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Zellen in 350 µl RLT-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen) mit Hilfe eines Zellspatels vollständig lysiert. Der Guanidinthiocyanat-reiche RLT-Puffer diente hierbei auch der Denaturierung von Proteinen, insbesondere von RNAsen. Für die Gewinnung von Protein wurden die Zellen auf Eis in 100 µl RL-Puffer (**Tabelle 7**) und zugesetztem Phosphataseinhibitor mit Hilfe eines Zellspatels vollständig lysiert.

Probenaufreinigung und RNA-/Protein-Extraktion

RNA-Isolierung

Die RNA wurde aus der durch Lyse gewonnenen Zellsuspension mit Hilfe des RNeasy Isolation Kit von Qiagen isoliert. Hierzu wurde zunächst das gleiche Volumen an 70% Ethanol zu den Proben gegeben, sorgfältig durch Pipettieren vermischt und anschließend die Suspension auf die Isolierungssäule gegeben. Anschließend wurde entsprechend den Herstellerangaben die Gesamt-RNA aufgereinigt. Die an die Siliziumdioxid-Membran der Säule gebundene RNA wurde durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und nachfolgender Zentrifugation bei 8000 g eluiert. Anschließend wurde die gelöste RNA sofort auf Eis gekühlt. Die Konzentration der gewonnenen RNA-Lösung wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurden 3 µl RNA mit 67 µl RNase-freiem Wasser versetzt und die Absorption nach Kalibrierung des Spektralphotometers mit 70 µl RNase-freiem Wasser bei 260 nm gemessen. Die RNA-Proben wurden bei -80 °C gelagert.

Proteinisolierung

Die Zelllysate wurden für 1 Stunde unter gelegentlichem Mischen auf Eis inkubiert und anschließend 6 Minuten bei 4 °C und 5200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet sowie aufliegendes Fett verworfen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde durch Zugabe von 300 µl Bradford-Reagenz zu 1,5 µl Probe bestimmt. Nach 5 Minuten Inkubationszeit und 10 Sekunden Schütteln wurde die Absorption bei 630 nm im Spektralphotometer bestimmt. Durch Messen der Absorption einer Standardreihe von BSA-Lösungen (2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,03125 mg/ml) wurde die Konzentration der zu bestimmenden Probe mittels der Steigung der Ausgleichgeraden durch die Standard-Absorptionswerte berechnet. Die Proteinproben wurden bei -20 °C gelagert.

Quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qPCR)

cDNA Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von ThermoScientific gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Synthese wurde 2 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde entsprechend ihrer Konzentration auf ein Volumen von 20 µl mit RNase freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden je 2 µl Oligo-dT-Primer und Random Hexamer-Primer zugegeben und für das Annealing 5 Minuten bei 70 °C im Eppendorf Mastercycler personal inkubiert. Anschließend wurden 16 µl eines Mastermixes (**Tabelle 12**) zu den Proben zugegeben und zunächst 5 Minuten bei 37 °C und anschließend für den Synthesevorgang 1 Stunde bei 42 °C inkubiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Mastermixes für die cDNA-Synthese

	Substanz
2 µl	RNase Inhibitor (Ribolock)
2 µl	Reverse Trankriptase (RevertAid)
8 µl	Reaction Mix 5x
4 µl	dNTP Mix

Zum Inaktivieren der reversen Trankriptase wurde am Ende der Synthese 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Quantitative PCR

Die Expression verschiedener Gene wurde mit Hilfe quantitativer PCR mit dem Thermocycler TOptical von Biometra bestimmt. Die Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green, der im Laufe der qPCR eine Quantifizierung der amplifizierten cDNA ermöglicht. Die einzusetzenden Primer wurden in einer Konzentration von 10 pmol/µl verwendet. Folgender Mastermix wurde je Gen pipettiert (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Zusammensetzung des Mastermixes für die qPCR

	Substanz
12,5 µl	SYBR Green Mix
1,5 µl	Forward Primer
1,5 µl	Reverse Primer
7,0 µl	H ₂ O

Die zu untersuchende cDNA wurde im Verhältnis 1:100 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Je Ansatz wurden 2,5 µl cDNA und 22,5 µl Mastermix in einer 96-Well-Platte pipettiert. Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten. Anschließend wurde die qPCR mit folgendem Temperaturzyklus durchgeführt (**Tabelle 14**).

Tabelle 14: Protokoll der qPCR

qPCR Temperaturzyklus			
	10 Minuten	95 °C	Denaturierung
45 x Zyklus	20 Sekunden	95 °C	Denaturierung
	20 Sekunden	58 °C	Annealing
	30 Sekunden	72 °C	Synthese und Fluoreszenzmessung
Schmelzkurve (60 °C – 95 °C; ΔT = 1 °C)			

Die Berechnung der Ct-Werte wurde mit Hilfe des zugehörigen Programms qPCR Soft 3.1 durchgeführt. Anhand der Schmelzkurvenanalyse der DNA wurde die Qualität der ermittelten Ct-Werte überprüft. Die Berechnung der relativen Expression anhand der Ct-Werte erfolgte mit der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode¹⁹⁰. Zur Normalisierung der Expressionswerte wurde die Expression des Zielgens auf die konstante Expression des *housekeeping gene* HPRT1 (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1) als endogenen Standard bezogen.

Western Blot

Der spezifische Proteinnachweis erfolgte durch Western-Blot-Analyse. Zuerst wurden die Proteine einer Probe mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) anhand ihrer Größe aufgetrennt und anschließend mittels *semidry*-Transfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Anschließend wurden Primärantikörper und Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper eingesetzt, um eine Markierung und Anfärbung spezifischer Proteinbanden zu ermöglichen. Das eingesetzte Verfahren wird nachfolgend genauer beschrieben.

Proteine bis zu einer Größe von 100 kDa wurden in 10% Polyacrylamid-Gelen und ab einer Größe von 100 kDa in 8% Polyacrylamid-Gelen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden Trenn- und Sammelgel im Verhältnis 3:1 zwischen zwei durch Spacer getrennte Platten gegossen. Der Boden der Gelkammer wurde zuvor durch eine dünne Schicht Dichtungsgel verschlossen (**Tabellen 15, 16, 17**).

Tabelle 15: Zusammensetzung des Dichtungsgels für die Polyacrylamidgelelektrophorese

	Substanz
2,5 ml	Nanopure H ₂ O
2,5 ml	PAA 30%
100 µl	APS 10%
20 µl	TEMED

Tabelle 16: Zusammensetzung des Trenngels für die Polyacrylamidgelelektrophorese

		Substanz
8%	10%	
PAA-Konzentration		
13,9 ml	11,9 ml	Nanopure H ₂ O
8 ml	10 ml	PAA 30%
7,5 ml	7,5 ml	TRIS 1,5 M, pH 8,8
300 µl	300 µl	SDS 10%
300 µl	300 µl	APS 10%
18 µl	12 µl	TEMED

Tabelle 17: Zusammensetzung des Sammelgels für die Polyacrylamidgelelektrophorese

	Substanz
6,8 ml	Nanopure H ₂ O
1,7 ml	PAA 30%
1,25 ml	TRIS 1 M, pH 6,8
100 µl	SDS 10%
100 µl	APS 10%
10 µl	TEMED

Nach abgelaufener radikalischer Polymerisation des Gels wurde je Probe 35 µg Protein aufgetragen. Zu dem aliquotierten Volumen Proteinlösung wurde das gleiche Volumen Auftragspuffer (**Tabelle 8**) pipettiert und 5 Minuten in kochendem Wasser erhitzt. Anschließend wurden die Taschen des Gels mit den Proben beladen und in einer Trennkammer mit Elektrophoresepuffer 1x (**Tabelle 9**) aufgetrennt. Hierzu wurde zunächst eine Spannung von 160 V angelegt. Nach Erreichen des Trenngels durch die Proben wurde eine Spannung von bis zu 240 V angelegt.

Nach ausreichender Auftrennung der Proteine wurde das Gel aus den beiden Glasplatten gelöst und zurechtgeschnitten. Der Transfer erfolgte nach dem *Semidry-Blotting*-Prinzip. Hierzu wurden 3 Lagen in Transferpuffer 1x (**Tabelle 10**) getränktes Filterpapier, die in Nanopure Wasser getränkte Nitrocellulosemembran (Dicke 0,45 µm), das Proteingel und erneut 3 Lagen in Transferpuffer 1x getränktes Filterpapier übereinandergelegt und in einer Transferkammer für 2 Stunden eine Stromstärke von 140 mA (1 Gel) bzw. 280 mA (2 Gele) angelegt.

Nach Abschluss des Transfers wurden die verbliebenen, freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit 5% Milchpulver, gelöst in TBST (1x TBS (*Tris-buffered saline*) + 0,2% Tween-20), für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler abgesättigt. Die Primärantikörper zum Nachweis spezifischer Proteine (**Tabelle 3**) wurden in der Verdünnung 1:5000 entweder in 5% Milchpulver- oder 5% BSA-TBST gelöst. Für eine längere Haltbarkeit wurde zudem 0,05% Natriumazid zugesetzt. Die Nitrocellulosemembran wurde mit 50 ml Primärantikörperlösung benetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde dreimal für je 10 Minuten bei Raumtemperatur mit TBST gewaschen und anschließend 50 ml Sekundärantikörperlösung (**Tabelle 4**) für 2 Stunden bei 4 °C auf die Membran gegeben. Die Sekundärantikörper wurden entweder in 5% Milchpulver (Primärantikörper in Milchpulver gelöst) oder TBST (Primärantikörper in BSA gelöst) im Verhältnis 1:20000 verdünnt. Anschließend wurde erneut dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 1,5 ml Chemilumineszenz-Substratgemisch (Western Bright Chemilumineszenz Substrat Quantum, Western Bright Chemilumineszenz Substrat Sirius, Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents) auf die Nitrocellulosemembran. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte im ChemiDoc™ Touch Imaging System von BIORAD unter Einstellung geeigneter Belichtungszeiten. Die densitometrische Auswertung und grafische Aufarbeitung erfolgte durch das zugehörige Programm Image Lab (Version 5.2).

Proliferationsmessung

Zellzählung nach Trypsinablösung

Als ein Verfahren der Proliferationsmessung kultivierter Zellen wurden die Zellen von der Zellkulturschale mittels Trypsinbehandlung abgelöst und anschließend die Zellzahl durch Auszählung in einem Hämozytometer nach Neubauer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst dreimal mit 3 ml sterilem PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin für 7 Minuten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach vollständiger Ablösung der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von

2 ml DMEM mit 1% PSM und 10% FCS gestoppt, sowie die abgewaschenen Zellen in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur und 234 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das verbliebene Zellpellet in 200 µl DMEM mit 1% PSM und 10% FCS resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl 0,4% Trypan-Blau-Lösung zum Anfärben avitaler Zellen versetzt. 5 µl dieser Zellsuspension wurden in einem 0,1 mm tiefen Hämocytometer nach Neubauer mit einer Gesamtfläche von 0,0025 mm² unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Hierzu wurde das arithmetische Mittel der Zellzahl aus vier ausgezählten Quadranten berechnet. Anschließend wurde anhand des Volumens der Zählkammer und des Verdünnungsfaktors die Zellzahl in der Ausgangslösung und somit die Gesamtzahl der Zellen pro Platte berechnet. Zur Analyse und quantitativen Auswertung doppelkerniger Sternzellen wurden die zu analysierenden Sternzellkulturen im Lichtmikroskop mit Phasenkontrasteinrichtung begutachtet und anschließend in vier zufällig gewählten Bildausschnitten unterschiedlicher Zellpräparationen Zellen mit zwei Zellkernen gezählt.

BrdU-ELISA

Als weiteres Verfahren der Proliferationsmessung – oder genauer – der Quantifizierung der DNA-Synthese wurde ein *Bromdesoxyuridin-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (BrdU-ELISA) durchgeführt. Hierzu wurde das Cell Proliferation ELISA Kit von Roche verwendet. Isolierte hepatische Sternzellen wurden dabei auf eine 96-Well-Platte in einer Zelldichte von 30.000 Zellen pro Platte ausgebracht und mit 200 µl Grundmedium je Well kultiviert. Am Tag 1 nach Isolierung wurde ein Medienwechsel auf serumfreies DMEM Medium (1% PSM, 1% ITS+3) durchgeführt und die Zellen erneut für 24 Stunden inkubiert. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen je nach Ansatz entweder mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors des PDGFR (Crenolanib) für 2 Stunden vorinkubiert oder erneut mit Medium inkubiert. Hierzu wurden 100 µl Medium je Well verwendet. Nach der Vorinkubation wurden 100 µl serumfreies DMEM Medium mit den verschiedenen Konzentrationen der Liganden PDGF-BB und PDGF-DD auf die vorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen gegeben, sodass in jedem Well ein Gesamtvolumen von 200 µl Medium vorlag. Zusätzlich wurde zu jedem Well 20 µl BrdU-labeling-Lösung gegeben, die das Bromdesoxyuridin enthielt. Die Messung erfolgte jeweils in Triplikaten.

Die Zellen wurden für 48 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert. Nach 48 Stunden Inkubation erfolgte die Quantifizierung des BrdU-Einbaus in die DNA der Zellen mittels ELISA entsprechend den Herstellerangaben. Die Inkubationszeit der Substratlösung wurde dabei in Abhängigkeit von der Farbintensität gewählt und betrug meist 5 Minuten. Die Farbintensität wurde mittels spektralphotometrischer Messung bei 450 nm und einer

Referenzwellenlänge von 690 nm quantifiziert. Die Absorption kultivierter hepatischer Sternzellen ohne Zugabe von BrdU-labeling-Lösung wurde als Blindwert verwendet.

Mikroskopie

Gewebeschnitte der Leber

Zur Untersuchung der Histologie der Leber wurden Gefrierschnitte angefertigt. Hierzu wurden Leberpräparate nach Entnahme in flüssigem Stickstoff (-196 °C) schockgefroren. Diese Leberpräparate wurden im Kryotom (Leica CM 3050 S) bei -20 °C mit einer definierten Schichtdicke von 5 – 7 µm geschnitten, auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Die Schnitte wurden bei -20 °C gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung

Zur Färbung wurden entweder 1.500.000 Zellen auf Coverslips in 12-Well-Platten oder 1.000.000 Zellen auf 6 cm-Zellkulturschalen ausgebracht.

Zur Fixierung wurden die Zellen 5 Minuten mit eiskaltem 99,98% Methanol oder Formaldehyd (Roti Histofix 4%) benetzt. Anschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen. Zum Freilegen der Bindungsstellen wurden formalinfixierte Zellen vor der Färbung für 5 Minuten mit 0,01% Triton x-100 in PBS auf Eis inkubiert und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 10% FCS in PBS inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper im Verhältnis 1:100 in PBS mit 2% FCS verdünnt und die Zellen für mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur mit dem Antikörper inkubiert (**Tabelle 3**). Der Antikörper wurde nach Inkubation dreimal für 5 Minuten mit PBS abgewaschen. Als Sekundärantikörper wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 oder FITC markierte Antikörper verwendet (**Tabelle 4**). Die Sekundärantikörper wurden im Verhältnis 1:500 (Cy3) und 1:100 (FITC) in PBS mit 2% FCS verdünnt. Die Zellen wurden für mindestens 2 Stunden mit dem Sekundärantikörper unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Bei Ko-Färbungen wurde nach dem gleichen Vorgehen zusätzlich mit je einem weiteren Primär- und Sekundärantikörper gefärbt. Nach Abschluss der Fluoreszenzfärbung wurden die Zellen auf Objektträgern unter gleichzeitiger Kernfärbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) *with Fluoromount G* eingedeckt.

UV-Fluoreszenz

Hepatische Sternzellen zeigen durch ihren hohen Anteil an eingelagerten Retinoiden eine Eigenfluoreszenz nach Belichtung mit UV-Licht, die zu ihrem Nachweis verwendet wird^{1,3}. Hierzu wurden hepatische Sternzellen mit Hilfe der Quecksilberlichtquelle Olympus U-RFL-

T von Olympus Optical CO.LTD. mit UV-Licht der Wellenlänge 350 nm angeregt und die Eigenfluoreszenz unmittelbar danach lichtmikroskopisch erfasst.

Lichtmikroskopie

Alle mikroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Lichtmikroskop Olympus IX50-S1F2 (10x Objektiv: CPlan 10x / 0,25 PhC, 20x Objektiv: LCPlanFI 20x / 0,40 Ph1, 40x Objektiv: UPlanFLN 40x / 0,75 Ph2, Olympus Optical CO.LTD.) angefertigt. Die Speicherung und Verarbeitung erfolgte mit der Software Cell[^]F von Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Version 2003. Für Fluoreszenzaufnahmen wurde die Quecksilberlichtquelle Olympus U-RFL-T, Olympus Optical CO.LTD. als Fluoreszenzquelle mit den Filtersätzen von Olympus und Chroma Technology (U-MWU, BP 330-385 nm, DM 400 nm, BA 420 nm; U-MNIBA2, BP 470-490 nm, DM 510 nm, BA 510-550 nm; U-M41007A, BP 525-560 nm, BA 594 nm) benutzt. Die hochauflösende Mikroskopie wurde mit einem ELYRA-Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena) in Kooperation mit Herrn Dr. Böris Görg (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Düsseldorf) durchgeführt.

Statistische Analyse

Die Einzelwerte wurden als arithmetisches Mittel bestimmt und mit dem errechneten Standardfehler angegeben. Statistische Signifikanz wurde beim Vergleich von 2 Gruppen mit Hilfe des nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Tests geprüft. Beim Vergleich von n Gruppen wurde als Korrelat der Varianzanalyse der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Zur anschließenden Signifikanzanalyse mehrerer Gruppen relativ zur Kontrolle wurde der Dunn's Test als Post-hoc-Test angewendet. Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm WinSTAT[®] (Version 2009.1) für Microsoft Excel und GraphPad Prism (Version 7.03). Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

Ergebnisse

Nachweis der PDGF-Rezeptoren sowie deren Liganden während der Leberregeneration

Die Beobachtung, dass während der stammzellbasierten Leberregeneration im Gegensatz zur normalen Leberregeneration der PDGFR β und seine Liganden verstärkt exprimiert werden (siehe Einleitung), konnte auch auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden. Hier zeigte sich an Leberschnitten von Tieren mit PHX/2AAF-Behandlung eine deutlich stärkere Färbung des PDGFR β in der Immunfluoreszenz an Tag 7 der Regeneration im Vergleich zu Tieren mit PHX-Behandlung. Der PDGFR β ließ sich dabei besonders im Bereich der von den Portalfeldern ausgehenden duktilären Reaktion nachweisen, die durch CK19-positive Zellen (Cholangiozyten oder LPCs bzw. Ovalzellen) gekennzeichnet ist (**Abb. 6 D**). Mittels hochauflösender Mikroskopie zeigte sich zudem, dass PDGFR β -positive Zellen die duktiläre Reaktion unmittelbar als klare Grenzschicht zum umgebenden Parenchym umranden. Dabei zeigte sich keine Ko-Expression von PDGFR β und CK19 (**Abb. 6 F**). Allerdings zeigte sich eine Ko-Expression von PDGFR β und α SMA, als Marker aktivierter hepatischer Sternzellen (**Abb. 6 B**). Die Kontrollschnitte von Tieren an Tag 7 nach alleiniger PHX zeigten keine verstärkte Färbung des PDGFR β , keine duktiläre Reaktion mit CK19-Expression sowie keine Expansion α SMA-positiver Zellen. Hierbei konnte der PDGFR β , ähnlich der Schnitte an normaler Leber (**Abb. 9**), im Bereich der Sinusoide sowie in der Umgebung der Gefäße der Portalfelder nachgewiesen werden. CK19 konnte in Gallengängen des Portalfeldes nachgewiesen werden (**Abb. 6 A, C**). Der PDGFR α ließ sich nach PHX/2AAF-Behandlung am Leberschnitt im Vergleich zur Leberregeneration nach PHX nicht vermehrt nachweisen. Angedeutet zeigte sich jedoch außerhalb des Bereichs der duktilären Reaktion eine stärkere Anfärbung des PDGFR α als in direkter Umgebung der duktilären Reaktion (**Abb. 6 E**).

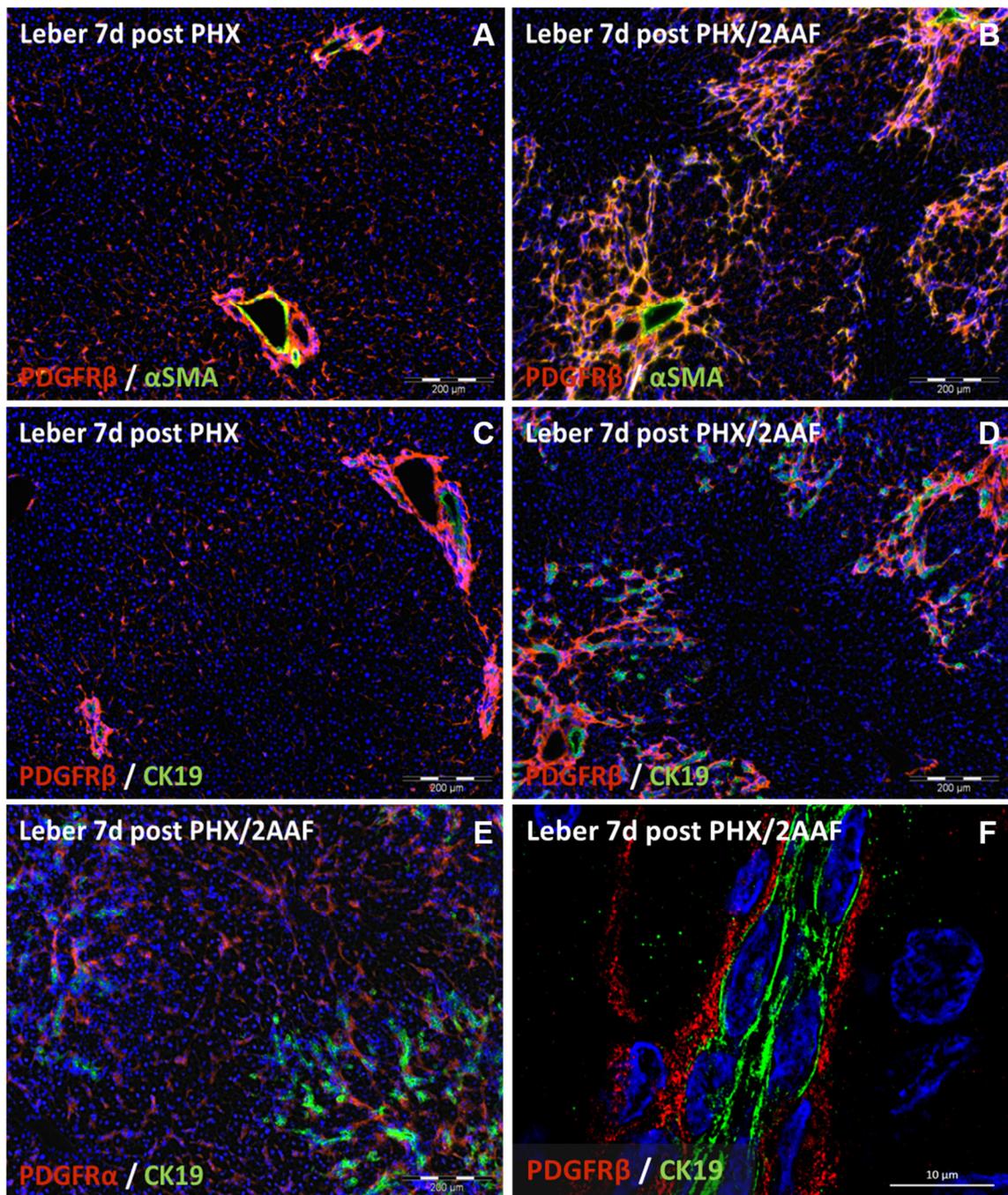


Abbildung 6: Nachweis des PDGFR β und des PDGFR α an Leberschnitten der Ratte während der Leberregeneration in zwei verschiedenen Leberschädigungsmodellen. Die PDGFR α und β wurden an Leberschnitten der Ratte mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Hierbei konnte der PDGFR β an Leberschnitten nach alleiniger partieller Hepatektomie in den Sinusoiden und als Umrandung der Portalfeldgefäße ähnlich der Verteilung der normalen Leber nachgewiesen werden (**A, C**). In dem Modell der stammzellbasierten Leberregeneration (PHX/2AAF) zeigte sich eine deutlich stärkere Färbung des PDGFR β als nach alleiniger partieller Hepatektomie (**B, D**). Die vermehrte Färbung zeigte sich dabei im Bereich der duktilären Reaktion. Hier umrandeten PDGFR β -positive Zellen die gangähnlichen Strukturen mit CK19-positiven Zellen (**D**). Mittels hochauflösender Mikroskopie (ELYRA) konnte eine deutliche Trennung zwischen der Färbung des PDGFR β und der Färbung von CK19 nachgewiesen werden, also eine deutliche getrennte Expression der beiden Marker (**F**). Die PDGFR β -positiven Zellen zeigten zudem eine Ko-Expression mit α SMA, einem Marker aktivierter Sternzellen (**B**). Der PDGFR α konnte an Schnitten der stammzellbasierten Leberregeneration (PHX/2AAF) in der Immunfluoreszenz nicht verstärkt angefärbt werden im Vergleich zur Kontrolle (PHX). Außerhalb der duktilären Reaktion konnte eine etwas stärkere Färbung des PDGFR α als im Bereich der duktilären Reaktion festgestellt werden (**E**). (n=3)

Zusammenfassend konnten die Befunde der Immunfluoreszenzuntersuchungen an Leberschnitten die Vorbefunde der deutlichen mRNA-Expressionssteigerung des PDGFR β während der stammzellbasierten Leberregeneration bestätigen.

Charakterisierung des Expressionsmusters kultivierter hepatischer Sternzellen

Für die weiteren *in vitro*-Experimente an hepatischen Sternzellen der Ratte wurden hepatische Sternzellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur (Tag 1, Tag 4, Tag 7) nach Isolierung mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich der Expression typischer Sternzellmarker charakterisiert. Dabei konnten die Intermediärfilamente Desmin und Vimentin über alle Zeitpunkte hinweg in kultivierten Sternzellen nachgewiesen werden (**Abb. 7 A-F**). GFAP als Marker ruhender Sternzellen konnte an Tag 1 und Tag 4 nach Isolierung als Filament nachgewiesen werden (**Abb. 7 G, H**). Im Verlauf der Kultivierung der hepatischen Sternzellen zeigte sich jedoch ein schrittweiser Abbau, sodass GFAP an Tag 7 nicht mehr in filamentöser Form, sondern globulär im Zytoplasma nachweisbar war (**Abb. 7 I**). α SMA als Marker aktivierter Sternzellen konnte an Tag 1 nach Isolierung nur in vereinzelt hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden (**Abb. 7 J**). Diese Expression steigerte sich im Verlauf der Kultivierung von Sternzellen auf Plastik-Gewebekulturplatten, sodass an Tag 7 nach Isolierung α SMA in der Mehrzahl der hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden konnte (**Abb. 7 K, L**).

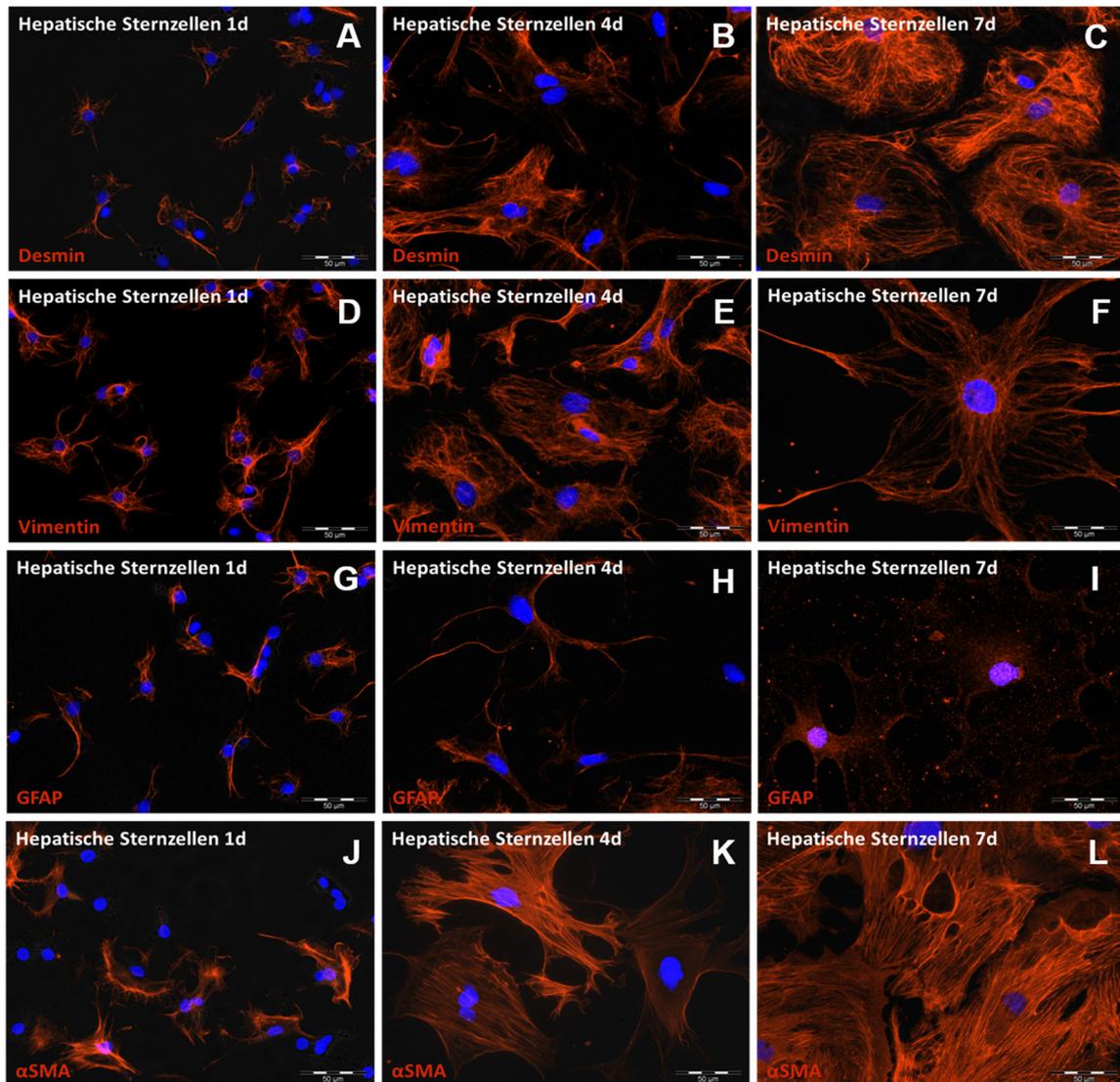


Abbildung 7: Nachweis typischer Sternzellmarker in kultivierten hepatischen Sternzellen. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 1, 4 und 7 nach Isolierung mit Methanol fixiert und mittels Immunfluoreszenz hinsichtlich der Expression der Marker Desmin, Vimentin, GFAP und α SMA analysiert. Alle isolierten hepatischen Sternzellen zeigten an Tag 1 nach Isolierung eine filamentartige Färbung der Marker Desmin, Vimentin und GFAP (**A, D, G**). Vereinzelt konnte in den Zellen an Tag 1 auch α SMA nachgewiesen werden (**J**). Während die Filamente Desmin und Vimentin auch an den Tagen 4 und 7 in allen hepatischen Sternzellen nachweisbar waren (**B, C, E, F**), konnte GFAP an Tag 7 nur noch globulär im Zytoplasma und nicht mehr als vollständiges Filament nachgewiesen werden (**I**). α SMA hingegen zeigte eine stärkere Expression unter Aktivierung in Kultur und konnte ab Tag 4 in allen hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden (**K, L**).

Die isolierten Sternzellen zeigten in den Immunfluoreszenzanalysen das typische Expressionsmuster ruhender bzw. aktivierter Sternzellen.

Nachweis mesenchymaler Stammzellmarker in kultivierten hepatischen Sternzellen

Hepatische Sternzellen wurden für 1, 4 und 7 Tage nach Isolierung kultiviert und hinsichtlich der Expression mesenchymaler Stammzellmarker mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei konnten die mesenchymalen Stammzellmarker CD44, Nestin und PDGFR β in kultivierten hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden. An Tag 1 nach Isolierung konnte nur in einem geringen Anteil der hepatischen Sternzellen der Marker CD44 nachgewiesen werden (**Abb. 8 A**). Nestin und PDGFR β konnten an Tag 1 nach Isolierung zwar in einem Großteil der hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden, allerdings zeigte sich meist nur eine schwache Färbung in der Immunfluoreszenz (**Abb. 8 D, G**). Im Verlauf der Aktivierung hepatischer Sternzellen unter Kulturbedingungen konnte eine deutlich gesteigerte Expression der mesenchymalen Stammzellmarker beobachtet werden. So konnten an Tag 4 und 7 nahezu in allen hepatischen Sternzellen CD44, Nestin und PDGFR β nachgewiesen werden (**Abb. 8 B, E, H**). Allerdings konnte innerhalb der untersuchten Sternzell-Population eine starke Variation der Expressionsstärke beobachtet werden. Zum Nachweis, dass es sich bei den untersuchten Zellen um isolierte hepatische Sternzellen und keine verunreinigenden Zellen anderer Zellpopulationen der Leber handelt, wurden Ko-Färbungen der Zellen mit den Sternzellmarkern Vimentin und Desmin durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Ko-Expression von Vimentin und Desmin mit den mesenchymalen Stammzellmarkern (**Abb. 8 C, F, I**).

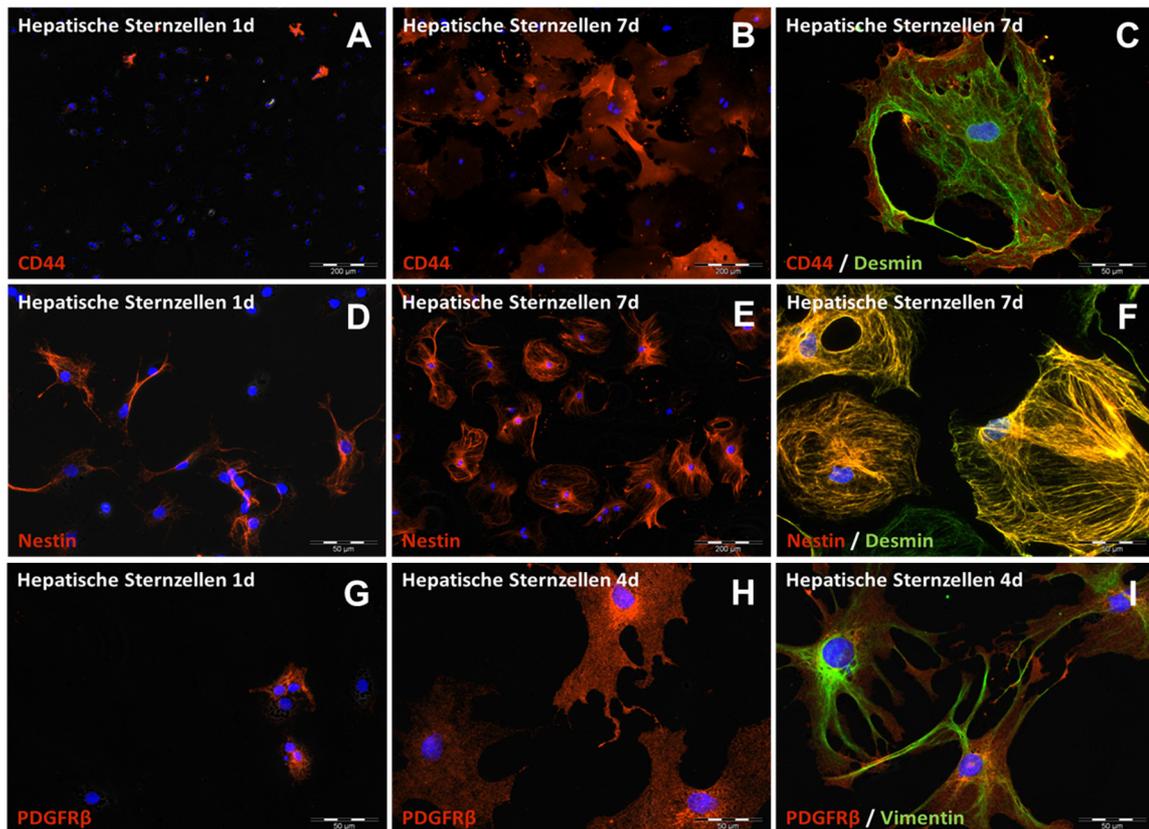


Abbildung 8: Nachweis mesenchymaler Stammzellmarker in hepatischen Sternzellen. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 1, 4 und 7 nach Isolierung mit Methanol fixiert und die mesenchymalen Stammzellmarker CD44, Nestin und PDGFR β gefärbt. An Tag 1 nach Isolierung konnten alle drei Marker nur in einzelnen Sternzellen nachgewiesen werden (**A, D, G**). Nestin und PDGFR β zeigten an Tag 1 eine häufigere und stärkere Färbung in den Sternzellen als CD44. Im Verlauf der Kultur wurden jedoch alle mesenchymalen Stammzellmarker verstärkt exprimiert, sodass in der Mehrheit der Sternzellen CD44, Nestin und der PDGFR β an Tag 4 und 7 nachgewiesen werden konnte (**B, E, H**). Zum Nachweis der Ko-Expression von typischen Markern der Sternzellen und mesenchymalen Stammzellen wurden Ko-Färbungen mit Desmin und Vimentin durchgeführt (**C, F, I**).

In isolierten hepatischen Sternzellen konnten wichtige Marker mesenchymaler Stammzellen nachgewiesen werden, deren Expression im Verlauf der Aktivierung gesteigert wurde.

Nachweis der PDGF-Rezeptoren in hepatischen Sternzellen *in vivo* sowie *in vitro*

Leberschnitte von unbehandelten Ratten wurden hinsichtlich der Expression des PDGFR β mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei konnte der PDGFR β in den Sinusoiden der Leber sowie im Bereich der Gefäßwände (α SMA-positiv) und Gallengänge (CK19-positiv) der Portalfelder nachgewiesen werden (**Abb. 9 A, B, C, D**). Es konnte zudem eine Ko-Expression des PDGFR β mit den Filamentproteinen GFAP und Desmin (**Abb. 9 E, F**) nachgewiesen werden. Die Ko-Expression mit GFAP und Desmin sowie die Lokalisierung

innerhalb der Sinusoide sprechen für eine Expression des PDGFR β in ruhenden, hepatischen Sternzellen der Ratten-Leber. In Hepatozyten konnte der PDGFR β mittels Immunfluoreszenz nicht nachgewiesen werden.

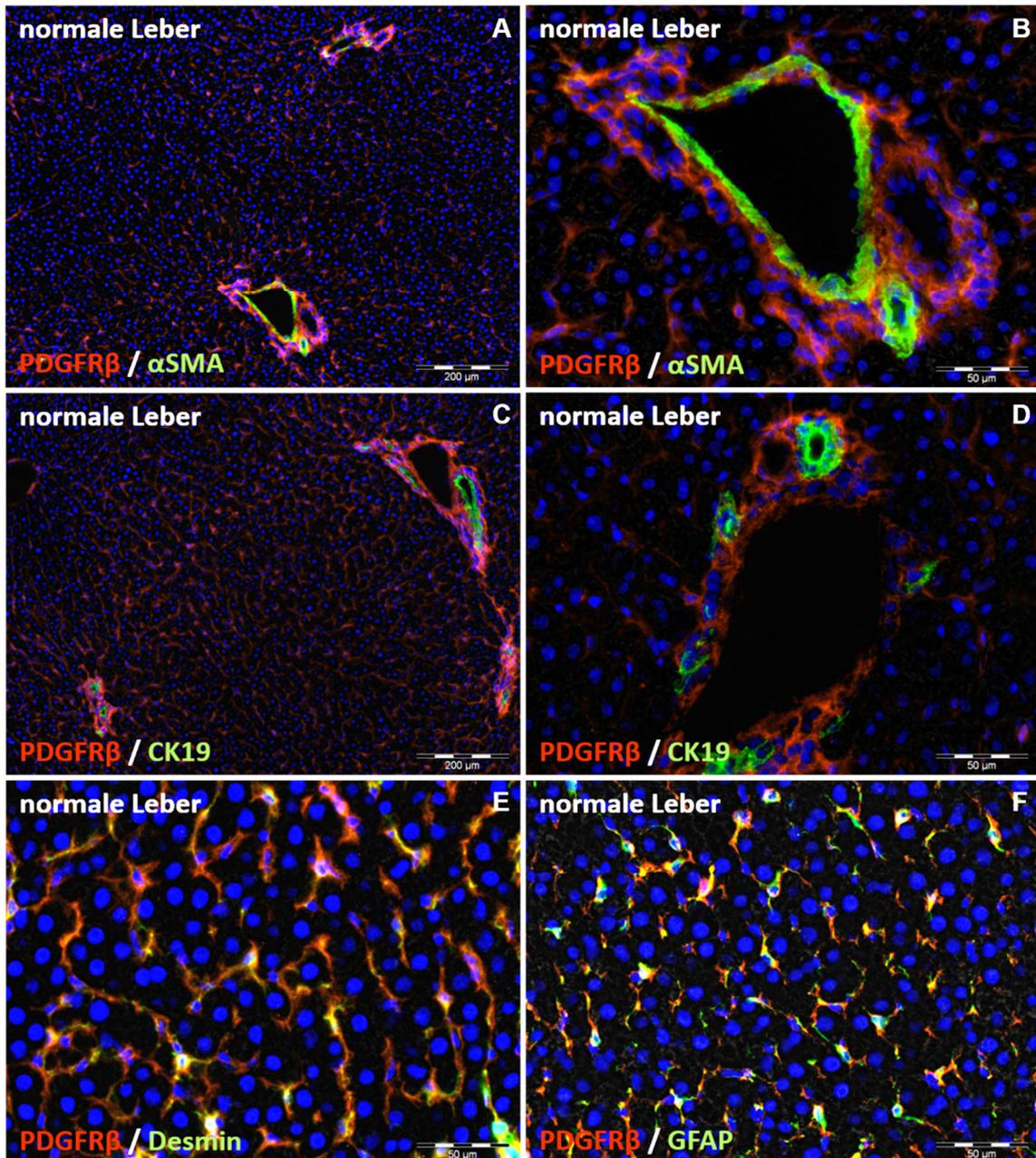


Abbildung 9: Nachweis des PDGFR β in der normalen Rattenleber. Der PDGFR β konnte mittels Immunfluoreszenz in den Sinusoiden sowie den Portalfeldern der Leber nachgewiesen werden. PDGFR β -positive Zellen zeigten dabei eine Ko-Expression (gelb) mit GFAP und Desmin, Markern von ruhenden hepatischen Sternzellen (E, F). Zudem konnte α SMA im Bereich der Gefäßwände des Portalfeldes (A, B) sowie CK19 im Bereich der Gallengänge nachgewiesen werden (C, D).

Auch *in vitro* konnte der PDGFR β in kultivierten hepatischen Sternzellen mittels Immunfluoreszenz sowie Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Dabei wurde die Ko-Expression des PDGFR β mit Vimentin und Desmin als Markern hepatischer Sternzellen überprüft (**Abb. 10**). Im Verlauf der Kultivierung von Tag 1 bis Tag 7 nach Isolierung und der damit einhergehenden Aktivierung hepatischer Sternzellen zeigte sich eine deutliche Steigerung der Proteinmenge des PDGFR β , die mittels Western Blot quantifiziert wurde (**Abb. 11**). Der PDGFR α konnte ebenfalls direkt nach der Isolierung in hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden und zeigte analog zum PDGFR β eine Steigerung der Proteinmenge im Verlauf der Kultivierung in Western-Blot-Analysen (**Abb. 11**).

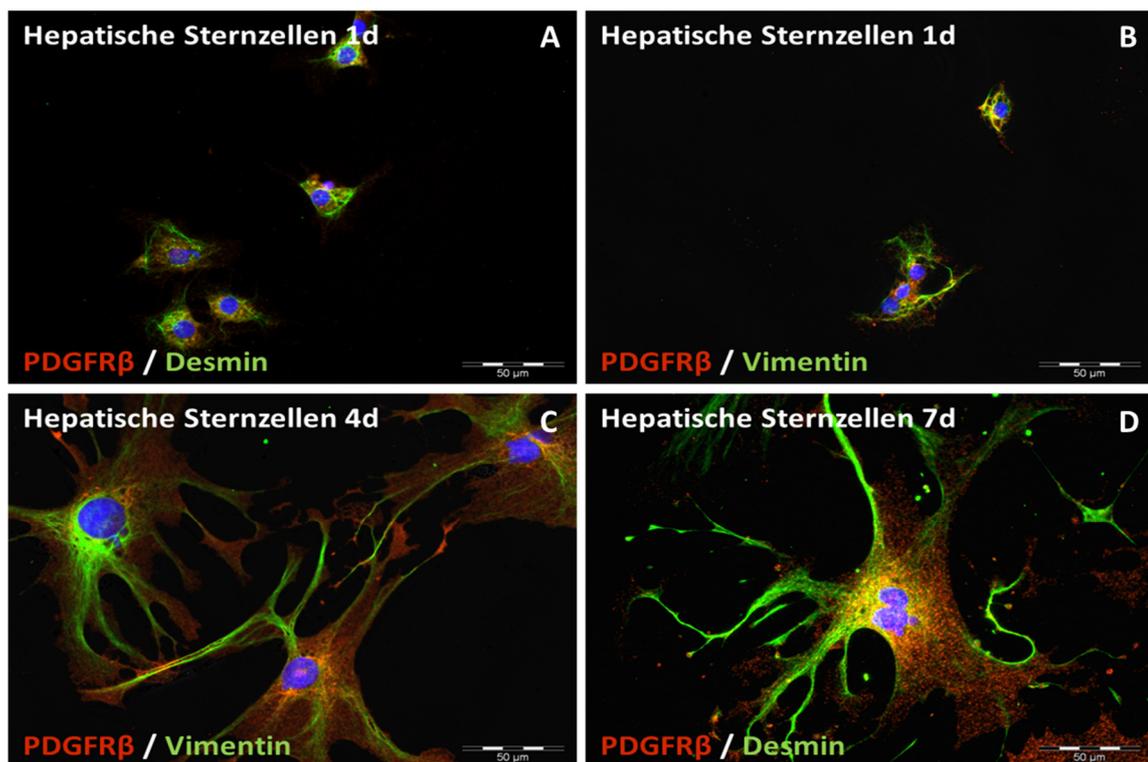


Abbildung 10: Nachweis des PDGFR β in hepatischen Sternzellen *in vitro*. Mittels Immunfluoreszenz konnte der PDGFR β an fixierten hepatischen Sternzellen an Tag 1 nach Isolierung bei Ko-Expression von Desmin (**A**) und Vimentin (**B**) nachgewiesen werden. An den Tagen 4 (**C**) und 7 (**D**) nach Isolierung zeigte sich eine noch intensivere Färbung des PDGFR β in hepatischen Sternzellen.

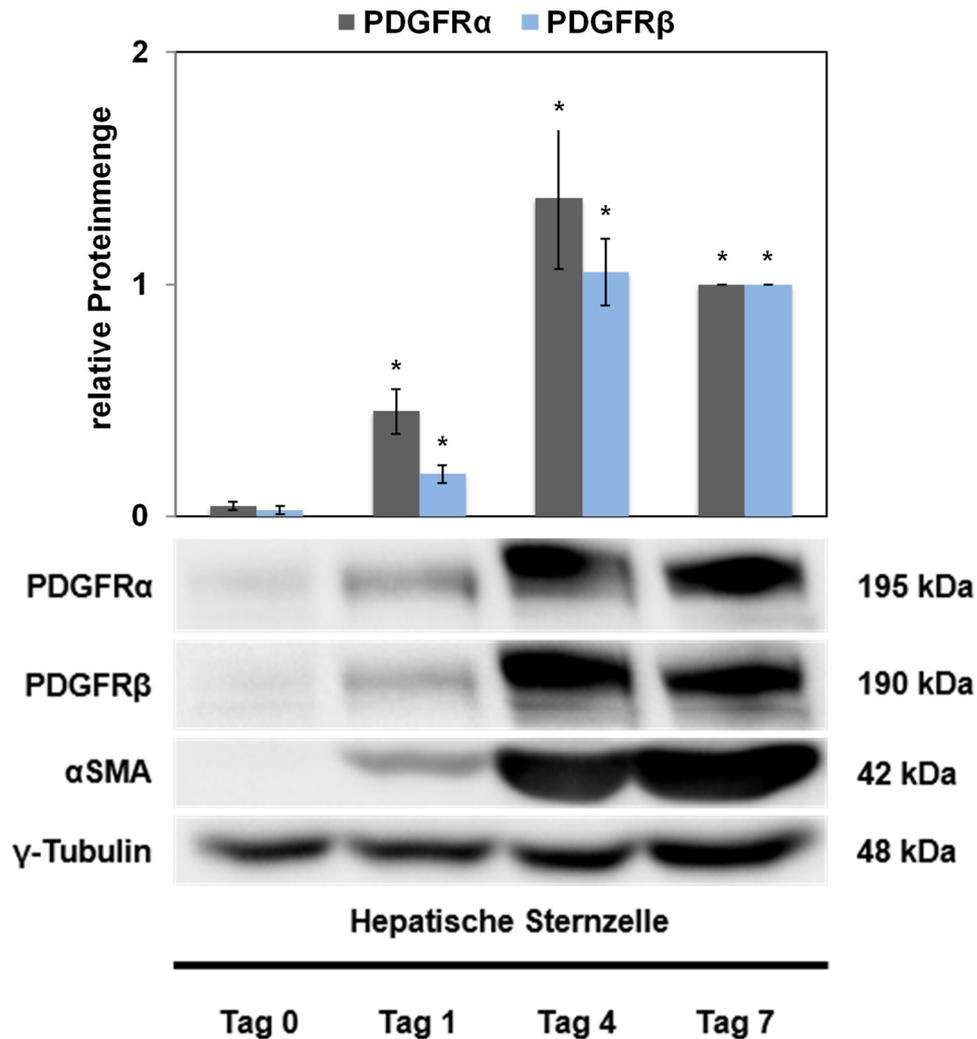


Abbildung 11: Nachweis des PDGFR β sowie des PDGFR α in hepatischen Sternzellen *in vitro* an Tag 1, 4 und 7 nach Isolierung. Eine Steigerung der Proteinmenge des PDGFR β sowie des PDGFR α im Verlauf der Kultivierung isolierter hepatischer Sternzellen der Ratte konnte mittels Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich an Tag 0 und 1 nach Isolierung ein schwacher Nachweis des PDGFR α sowie des PDGFR β . Mit Aktivierung der hepatischen Sternzellen unter Kulturbedingungen, die durch die Expressionssteigerung von α SMA nachvollzogen werden konnte, zeigte sich auch eine Steigerung der Proteinmenge des PDGFR α und PDGFR β an Tag 4 und 7. In der quantitativen Auswertung der Proteinmenge konnte an Tag 1, 4 und 7 nach Isolierung sowohl für den PDGFR α als auch für den PDGFR β eine signifikante Steigerung (*) der Proteinmenge im Vergleich zur Proteinmenge an Tag 0 nach Isolierung nachgewiesen werden. (Die Abbildung zeigt einen charakteristischen Western Blot als Auswahl der 3 durchgeführten Western Blots.) (n=3; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Zusammenfassend konnten der PDGFR α sowie der PDGFR β sowohl *in vivo* als auch *in vitro* in ruhenden und aktivierten hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden.

Proliferation von hepatischen Sternzellen unter Stimulation und Inhibition des PDGFR β -Signalwegs

Mittels Zellzählung wurde die Proliferation von kultivierten hepatischen Sternzellen unter Stimulation und Inhibition des PDGFR β untersucht. Hierzu wurden hepatische Sternzellen nach ihrer Isolierung für 72 Stunden mit den Liganden des PDGFR β , PDGF-BB und PDGF-DD, dem PDGFR-Inhibitor Crenolanib sowie einer Kombination von PDGF-BB und Crenolanib inkubiert. Hierbei zeigte sich unter Stimulation mit 20 ng/ml PDGF-BB und PDGF-DD eine signifikante 2,3-fache bzw. 2,1-fache Erhöhung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle. Unter Behandlung mit 10 ng/ml PDGF-BB und PDGF-DD zeigte sich eine nicht signifikante Erhöhung der Zellzahl auf das 1,5-fache bzw. 1,7-fache der Zellzahl der unbehandelten Kontrolle. Unter Behandlung mit Crenolanib zeigte sich eine nicht signifikante Reduktion der Zellzahl auf das 0,5-fache der Zellzahl der unbehandelten Kontrolle. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Proliferationssteigerung unter 10 ng/ml PDGF-BB durch Vorinkubation mit Crenolanib inhibiert werden konnte. Bei Kombination von 100 nM Crenolanib und 10 ng/ml PDGF-BB zeigte sich eine signifikant geringere Zellzahl im Vergleich zur Behandlung mit 10 ng/ml PDGF-BB allein (**Abb. 12**).

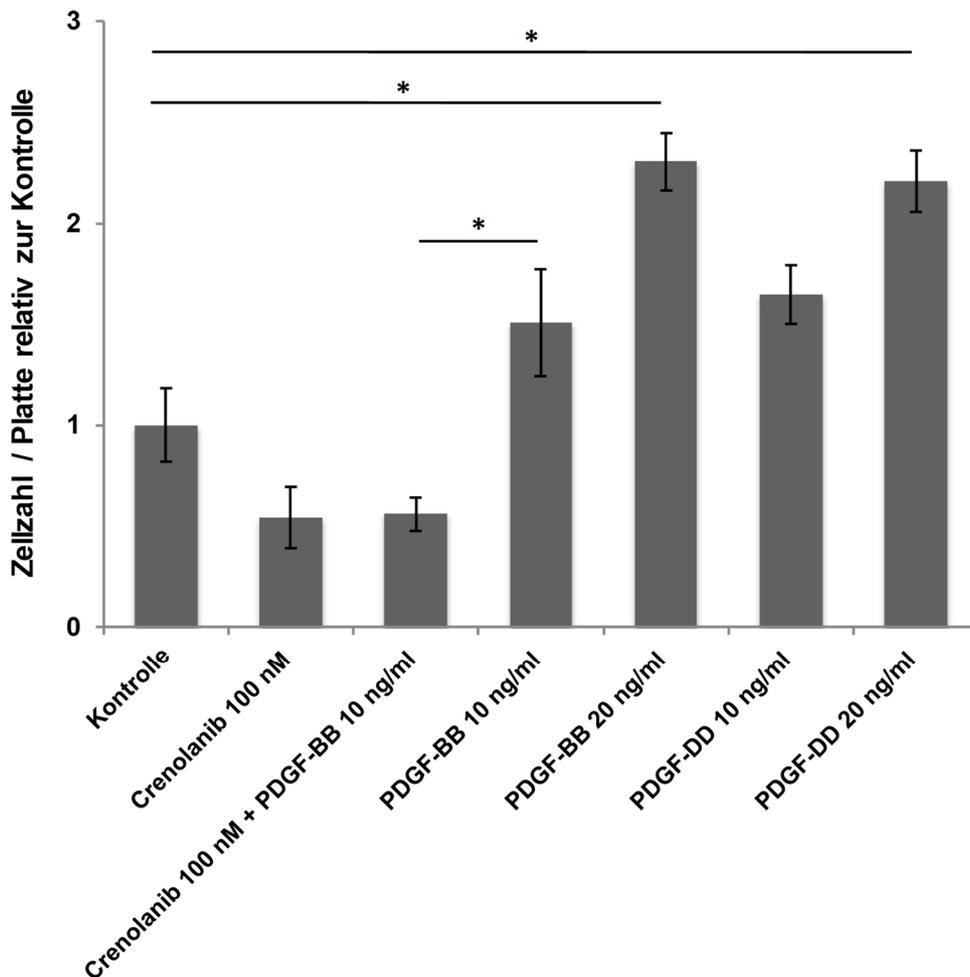


Abbildung 12: Untersuchung der Proliferation hepatischer Sternzellen nach Stimulation mit den Liganden des PDGFR β und dem PDGFR-Inhibitor Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden ab Tag 1 nach Isolierung für 72 Stunden mit den Liganden PDGF-BB und PDGF-DD in den Konzentrationen 10 ng/ml und 20 ng/ml sowie mit dem Inhibitor Crenolanib (100 nM) allein und einer Kombination aus 10 ng/ml PDGF-BB und 100 nM Crenolanib (Vorinkubation mit Crenolanib für 2 Stunden) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst und gezählt. Dabei konnte eine erhöhte Zellzahl unter Stimulation mit PDGF-BB und PDGF-DD im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Diese Proliferationssteigerung zeigte sich bereits bei Stimulation mit einer Konzentration von 10 ng/ml, allerdings konnte erst bei Stimulation mit 20 ng/ml Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Durch Kombination von 100 nM Crenolanib mit 10 ng/ml PDGF-BB konnte die beobachtete Proliferationssteigerung unter PDGF-BB signifikant gehemmt werden. (n=3-4; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Die Proliferation unter Stimulation mit Crenolanib und PDGF-BB sowie einer Kombination von Crenolanib und PDGF-BB wurde zudem mittels BrdU-ELISA untersucht. Die gemessene Absorption im Photometer ist bei diesem Verfahren proportional zum Einbau von BrdU in die DNA der untersuchten Zellen innerhalb der Inkubationszeit und dient damit als Maß für die DNA-Syntheseleistung der Zellen innerhalb des Untersuchungszeitraums.

Im Vergleich zur serumfreien Kontrolle konnte unter Zusatz von 10% FCS zum Kulturmedium ein Anstieg der Absorption als Maß für die DNA-Syntheseleistung nach 48 Stunden Inkubationszeit gemessen werden. Ein stärkerer und signifikanter Anstieg der

DNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich unter Behandlung mit 20 ng/ml PDGF-BB und 20 ng/ml PDGF-DD. Überraschenderweise konnte auch unter alleiniger Stimulation mit dem PDGFR-Inhibitor Crenolanib in den Konzentrationen 1 nM, 10 nM, 50 nM und 100 nM eine nicht signifikante Erhöhung der DNA-Synthese im Vergleich zur serumfreien Kontrolle und zur Behandlung mit 10% FCS festgestellt werden. Lediglich bei einer eingesetzten Konzentration von 1000 nM Crenolanib wurden ähnliche Absorptionswerte wie unter Behandlung mit 10% FCS gemessen. Eine kombinierte Stimulation der Sternzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Crenolanib und 20 ng/ml PDGF-BB zeigte eine signifikante Steigerung der DNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle, ähnlich der Synthesesteigerung unter 20 ng/ml PDGF-BB alleine (**Abb. 13**).

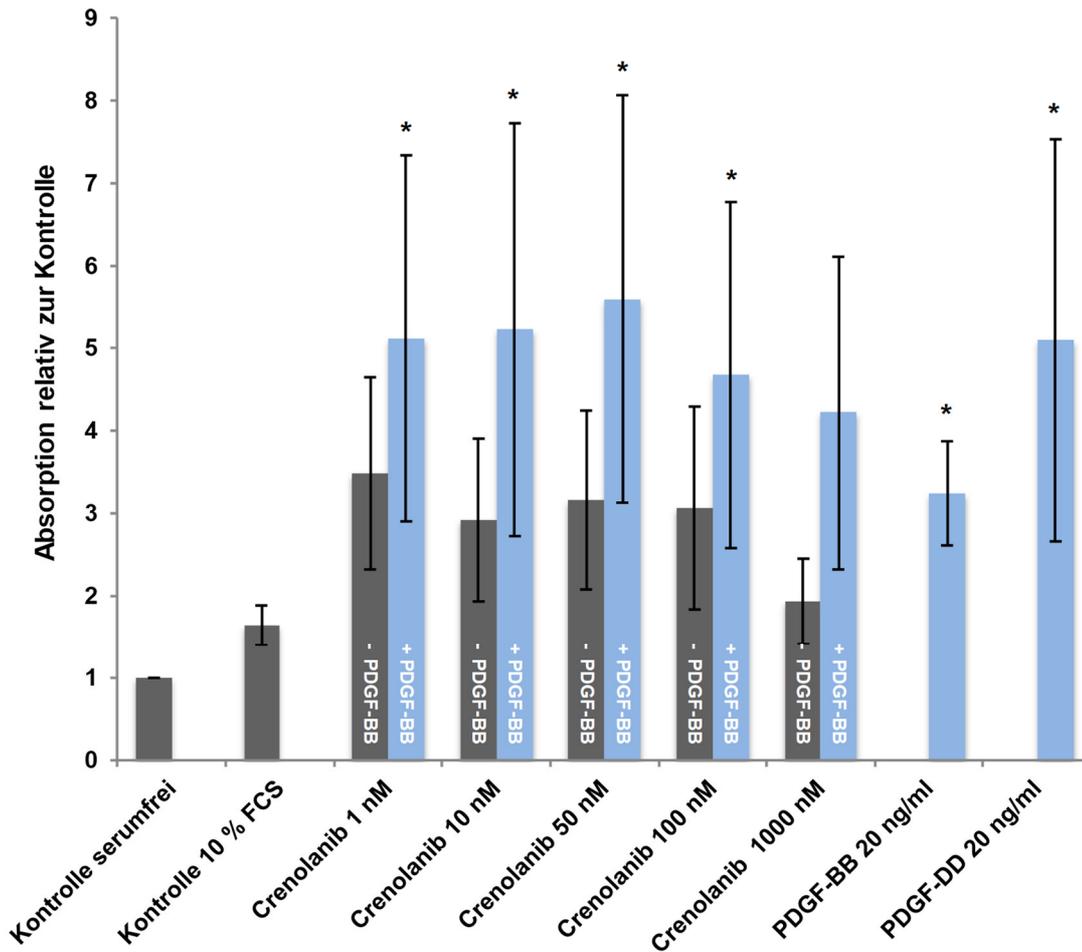


Abbildung 13: Messung der DNA-Synthese von hepatischen Sternzellen unter Crenolanib, PDGF-BB und PDGF-DD mittels BrdU-ELISA. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 1 nach Isolierung mit verschiedenen Konzentrationen von Crenolanib für 2 Stunden vorbehandelt und je nach Ansatz anschließend mit 20 ng/ml PDGF-BB stimuliert. Anschließend wurde der Einbau von BrdU nach 48 Stunden Inkubationszeit im Photometer quantifiziert. Es konnte ein Trend zur vermehrten DNA-Synthese unter Stimulation mit DMEM und 10% FCS im Vergleich zum serumfreien Medium beobachtet werden. Einen nicht signifikanten Anstieg der DNA-Synthese konnten wir auch nach Inkubation der hepatischen Sternzellen mit verschiedenen Konzentrationen von Crenolanib (1 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM) beobachten. Der geringste Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich dabei unter Stimulation mit 1000 nM Crenolanib. Unter Stimulation mit 20 ng/ml PDGF-DD und 20 ng/ml PDGF-BB zeigte sich der stärkste Anstieg der DNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Hier konnte Signifikanz im Vergleich zum Kontrollwert gezeigt werden. Dieser signifikante Anstieg zeigte sich unbeeinflusst von Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Crenolanib. (n=5; Varianzanalyse anhand des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests ($H=21,23$, $p=0,07$); anschließender Signifikanzvergleich aller Gruppen relativ zur serumfreien Kontrolle mit Dunn's Post-hoc-Test; Signifikanz (*) wurde angenommen bei $p < 0,05$.)

Die Ergebnisse der Zellzählung und der BrdU-Analyse ergaben hinsichtlich ihrer Aussage zur Proliferationssteigerung unter PDGF-BB und dem inhibitorischen Effekt von Crenolanib auf die Zellproliferation ein widersprüchliches Bild. Aufgrund der Ergebnisse der Zellzählung nach Trypsinablösung mit deutlicher Proliferationssteigerung unter PDGF-BB-Behandlung und Verminderung der Proliferation unter kombinierter Behandlung von Crenolanib und PDGF-BB, im Vergleich zur Behandlung mit PDGF-BB allein, erwarteten wir einen

ähnlichen Verlauf der gemessenen Absorption in der BrdU-Analyse. Dieses Absorptionsverhalten zeigte sich, wie zuvor beschrieben, allerdings nicht. Aufgrund der vorliegenden Daten des Zellzählungsexperiments (**Abb. 12**) kann die gemessene Absorptionssteigerung unter Crenolanib-Behandlung im BrdU-ELISA als Maß einer DNA-Synthesesteigerung nicht auf eine verstärkte Proliferation unter Crenolanib zurückgeführt werden. Zur Klärung der Ursache der gesteigerten DNA-Synthese unter Crenolanib-Behandlung wurden weitere Experimente durchgeführt. Als mögliche Erklärung für die Absorptionssteigerung im BrdU-ELISA unter Crenolanib wurden insbesondere Differenzierungsvorgänge in Sternzellen in Betracht gezogen.

Lichtmikroskopische Untersuchung hepatischer Sternzellen unter Crenolanib

Zur weiteren Untersuchung des Verhaltens hepatischer Sternzellen unter Behandlung mit Crenolanib und zur Klärung der Ursache der DNA-Synthesesteigerung unter Crenolanib wurden hepatische Sternzellen 7 Tage mit 100 nM Crenolanib behandelt und anschließend hinsichtlich ihrer Zellmorphologie lichtmikroskopisch beurteilt. Unter Kontrollbedingungen konnten nach 7 Tagen vereinzelt doppelkernige hepatische Sternzellen (rote Pfeile) beobachtet werden (**Abb. 14 A**). Unter Crenolanib-Behandlung zeigte sich jedoch ein deutlich häufigeres Vorkommen von doppelkernigen Zellen (rote Pfeile) im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 14 B**). Nach Auszählung der doppelkernigen Sternzellen ergab sich unter Crenolanib-Behandlung ein Anteil von 70% doppelkernigen Sternzellen an allen ausgezählten Sternzellen. Im Vergleich dazu zeigten nur 10% der Sternzellen unter Kontrollbedingungen zwei Zellkerne (**Abb. 14 C**).

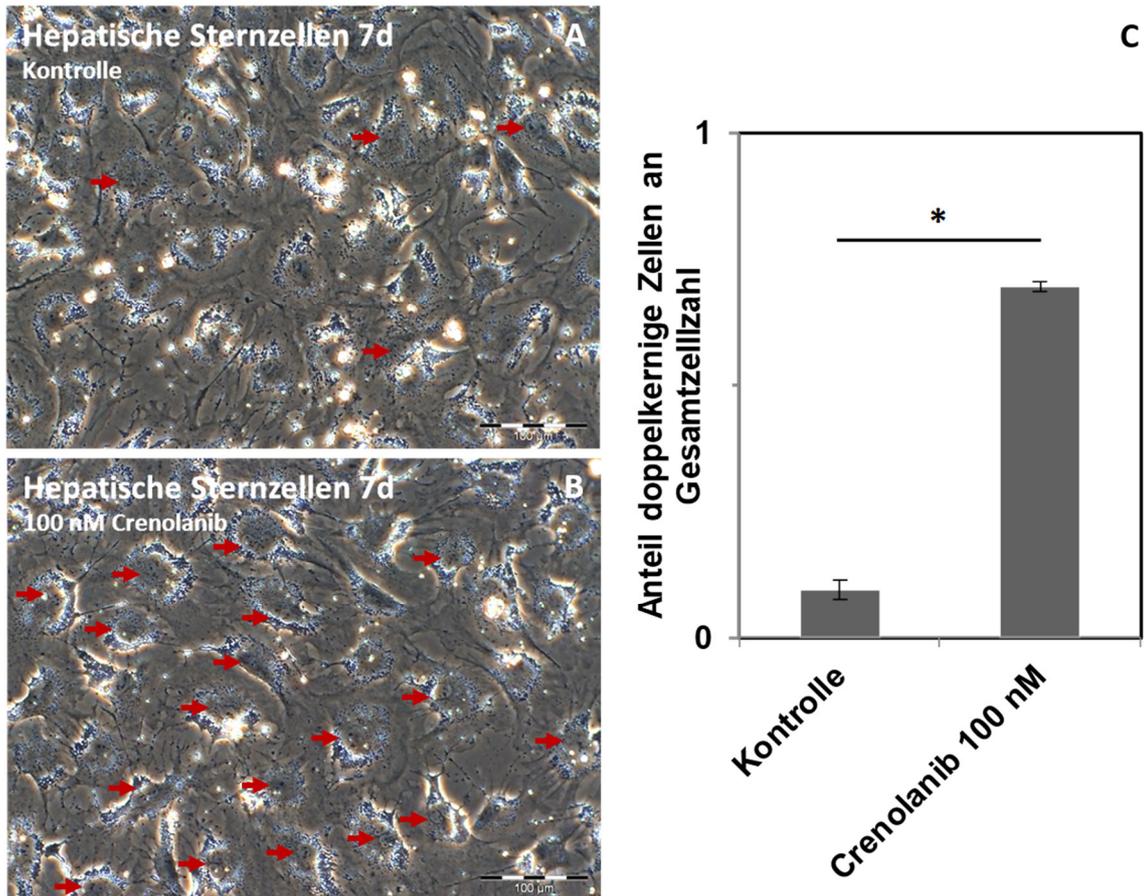


Abbildung 14: Lichtmikroskopische Untersuchung hepatischer Sternzellen nach 7 Tagen Behandlung mit Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden nach ihrer Isolierung 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beurteilt. Unter Kontrollbedingungen konnten vereinzelt doppelkernige hepatische Sternzellen festgestellt werden (rote Pfeile) (A). Unter Crenolanib-Behandlung hingegen zeigte sich eine deutliche Zunahme von mehrkernigen Zellen (rote Pfeile) im Vergleich zur Kontrolle (B). Nach Auszählung der doppelkernigen Zellen ergab sich unter Crenolanib-Behandlung ein Anteil von 70% doppelkernigen Sternzellen im Vergleich zu 10% doppelkernigen Sternzellen unter Kontrollbedingungen (C). Die Gesamtanzahl der Zellen pro Bildausschnitt wurde auf 100% gesetzt. (n=4; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Zusammenfassend konnte unter Crenolanib-Behandlung lichtmikroskopisch ein vermehrtes Auftreten von Sternzellen mit zwei Zellkernen beobachtet werden, welches die erhöhte DNA-Synthese unter Crenolanib-Behandlung erklären kann.

Induktion von Progenitorzell- sowie Hepatozytenmarkern unter Crenolanib

Um die vermehrte DNA-Synthese und Mehrkernigkeit unter Crenolanib zu erklären, wurden Zelldifferenzierungsprozesse unter Crenolanib-Behandlung in Betracht gezogen. Tatsächlich wurde eine Induktion von Markern hepatischer Progenitorzellen sowie Hepatozyten nach siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib festgestellt. Hierzu wurde die relative mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19, EpCAM und AFP sowie der Hepatozytenmarker CK18, HNF4 α , FOXA3, Albumin und BSEP mittels qPCR untersucht. Für die Marker CK19, EpCAM, CK18, HNF4 α , FOXA3, Albumin und BSEP zeigte sich eine signifikante mRNA-Expressionssteigerung in hepatischen Sternzellen nach siebentägiger Behandlung mit Crenolanib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für den Marker AFP zeigte sich zwar eine Steigerung der mRNA-Expression unter Crenolanib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, allerdings konnte keine Signifikanz gezeigt werden. Insgesamt konnten wir unter Crenolanib-Behandlung eine deutliche Induktion einer hepatischen Differenzierung in hepatischen Sternzellen beobachten (**Abb. 15**).

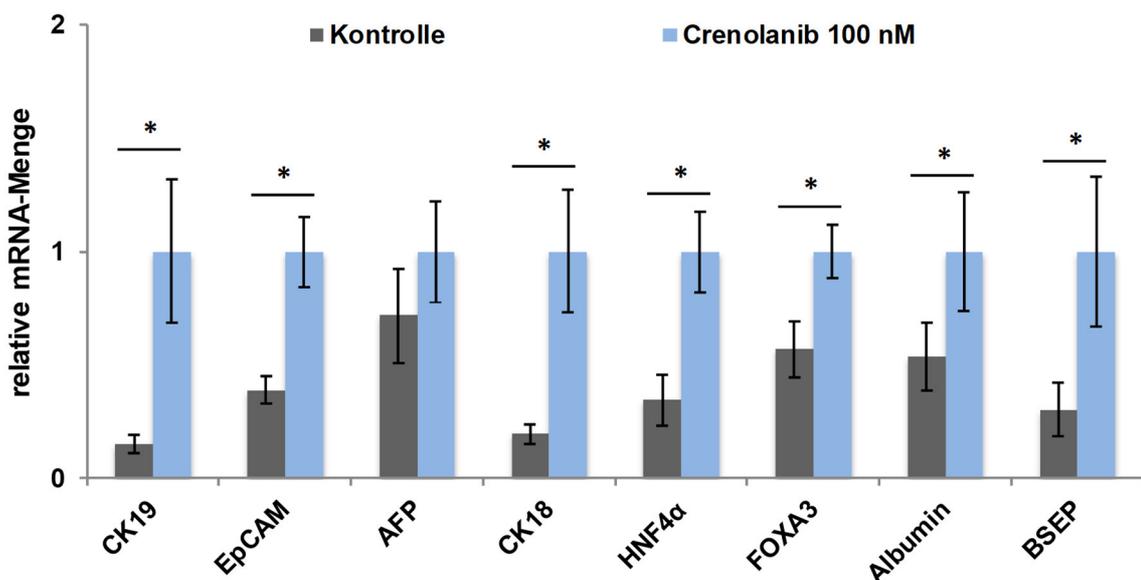


Abbildung 15: Induktion einer hepatischen Differenzierung von hepatischen Sternzellen unter Crenolanib-Behandlung. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19, EpCAM, AFP sowie der Hepatozytenmarker CK18, HNF4 α , FOXA3, Albumin und BSEP mittels qPCR quantifiziert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich unter 100 nM Crenolanib-Stimulation ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM sowie der Hepatozytenmarker CK18, HNF4 α , FOXA3, Albumin und BSEP. Dies gab einen klaren Hinweis auf eine Induktion einer hepatischen Differenzierung in Sternzellen. (n=3-18; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Einfluss der Konzentration von Crenolanib auf die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen

Wir untersuchten die Induktion der hepatischen und progenitorzelltypischen Marker CK19, EpCAM und CK18 nach siebentägiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Crenolanib (10 nM, 100 nM, 1000 nM) in hepatischen Sternzellen. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der mRNA-Expression aller Marker unter Stimulation mit 10 nM Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle. Bei einer Konzentration von 100 nM Crenolanib konnte eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der Marker CK19, EpCAM und CK18 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet werden. Die Behandlung mit 1000 nM Crenolanib zeigte ebenfalls eine Induktion der Marker CK19, EpCAM und CK18. Dabei wurde für die Marker CK18 und EpCAM eine größere Steigerung der mRNA-Expression unter 1000 nM Crenolanib als unter 100 nM Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die Expressionssteigerung des Markers CK19 zeigte sich jedoch deutlich geringer unter Behandlung mit 1000 nM Crenolanib als unter Behandlung mit 100 nM Crenolanib. (**Abb. 16**).

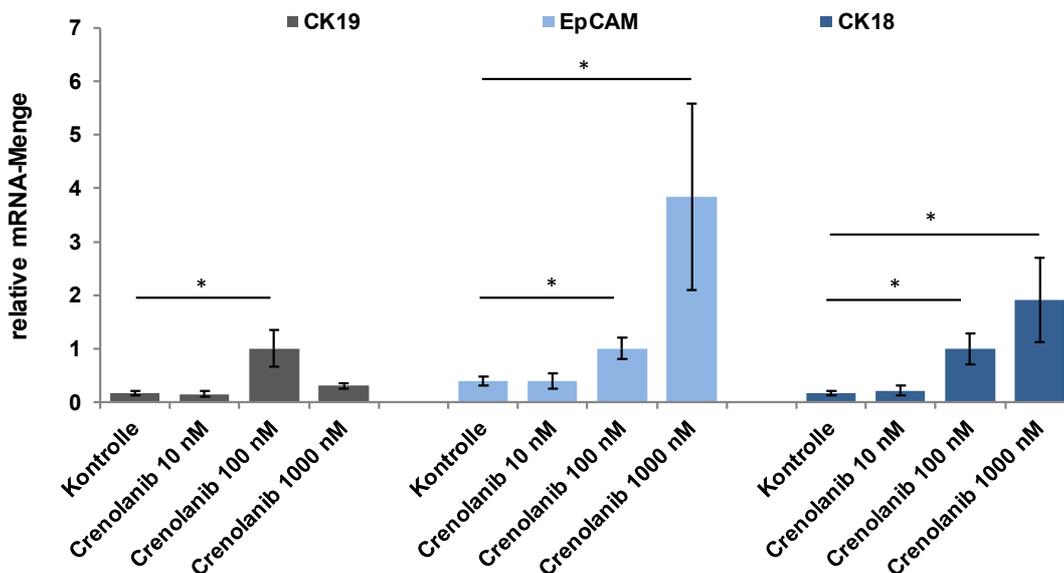


Abbildung 16: Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 10 nM, 100 nM sowie 1000 nM Crenolanib inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM sowie des Hepatozytenmarker CK18 mittels qPCR bestimmt. Unter Behandlung mit 10 nM Crenolanib konnte keine Veränderung der mRNA-Expressionswerte im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Unter Behandlung mit 1000 nM Crenolanib zeigte sich für einen Teil der Marker (EpCAM, CK18) eine größere Steigerung der mRNA-Expressionswerte im Vergleich zur Kontrolle als unter Behandlung mit 100 nM Crenolanib, andere Marker (CK19) hingegen zeigten eine geringere Steigerung der mRNA-Expressionswerte im Vergleich zur Kontrolle als unter Behandlung mit 100 nM Crenolanib. Die für alle Marker konstanteste Steigerung der mRNA-Expressionswerte im Vergleich zur Kontrolle konnte unter Behandlung mit 100 nM Crenolanib gemessen werden. (n=4; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Da die Behandlung mit 100 nM Crenolanib die konstanteste mRNA-Expressionssteigerung bei allen getesteten Genen zeigte und die Zellvitalität im Gegensatz zur Behandlung mit höheren Konzentrationen an Crenolanib nicht beeinträchtigte, wurde 100 nM Crenolanib als Konzentration für weiterführende Experimente gewählt.

Nachweis von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib mittels Immunfluoreszenz

Die beobachtete Expressionssteigerung des Progenitorzellmarkers CK19 auf mRNA-Ebene unter siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib (**Abb. 15**) konnte ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen werden. Hierzu wurde mittels Immunfluoreszenz eine Ko-Färbung des Filaments CK19 und des mesenchymalen Filaments Desmin durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen konnte das Filament Desmin als typischer HSC-Marker in den kultivierten hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Nach Behandlung mit 100 nM Crenolanib konnte in hepatischen Sternzellen zudem das Filament CK19 nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich Ansammlungen CK19-positiver Zellen in verstreut liegenden Zellclustern zwischen undifferenzierten Desmin-positiven hepatischen Sternzellen (**Abb. 17 A, B**). Die CK19-positiven differenzierenden hepatischen Sternzellen zeigten eine schwache Ko-Expression des mesenchymalen Filaments Desmin, als Nachweis ihrer Abstammung von Sternzellen (**Abb. 17 A/B: gelb; C/E, D/F: weiße Pfeile**).

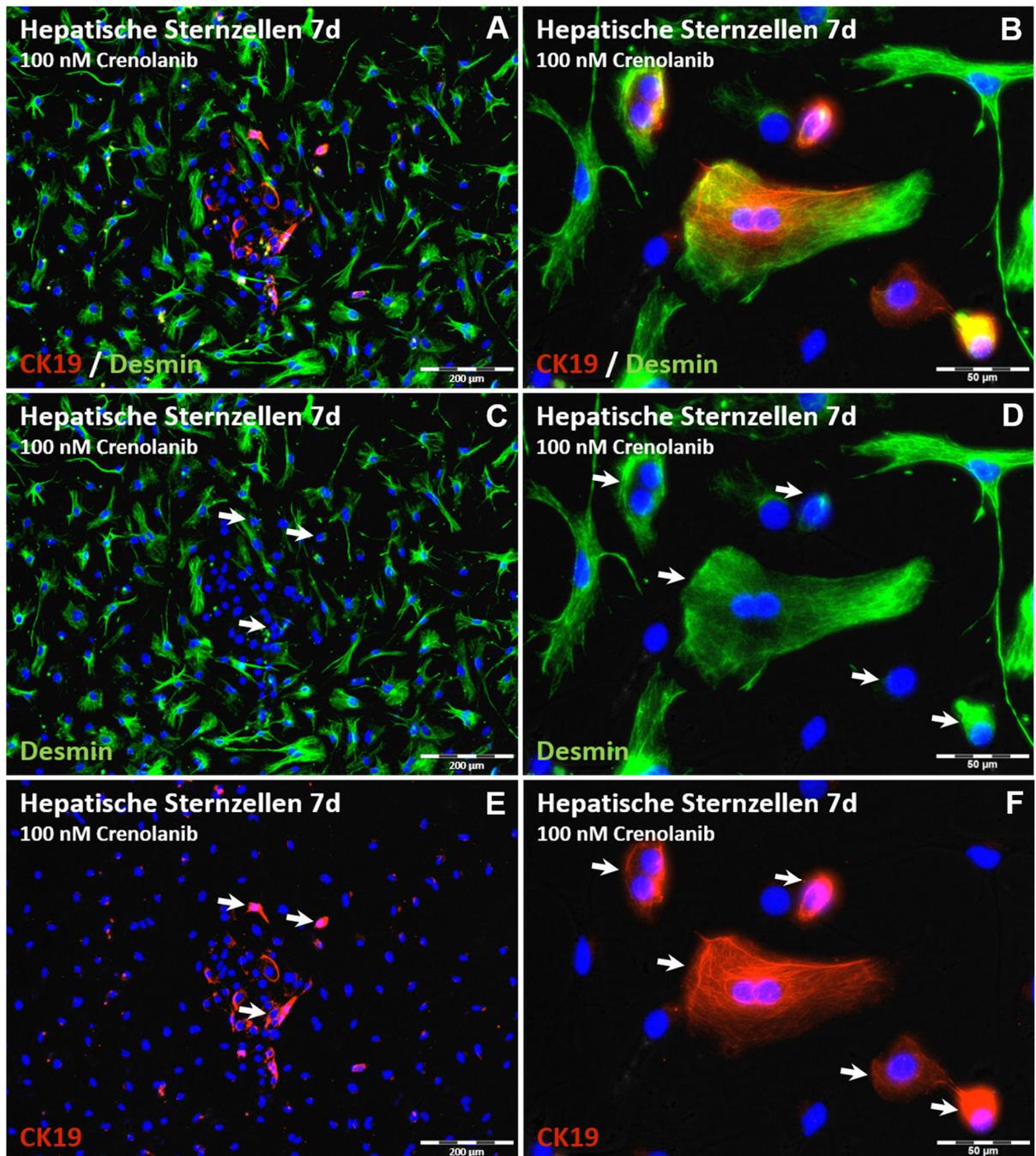


Abbildung 17: Nachweis des Progenitorzellmarkers CK19 in hepatischen Sternzellen nach Behandlung mit Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert; anschließend wurden der Progenitorzellmarker CK19 (rot) sowie der Sternzellmarker Desmin (grün) mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Die mit 100 nM Crenolanib behandelten hepatischen Sternzellen zeigten deutliche Cluster differenzierender Zellen, in denen der Marker CK19 nachgewiesen werden konnte, umgeben von nicht differenzierten hepatischen Sternzellen mit der typischen Färbung des Sternzellmarkers Desmin (A, B). Allerdings konnte auch in den CK19-positiven Zellen nach Crenolanib-Behandlung weiterhin der Sternzellmarker Desmin schwach nachgewiesen werden (weiße Pfeile) (C/E, D/F).

Auch die beobachtete Expressionssteigerung des Markers CK18 auf mRNA-Ebene unter siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib (**Abb. 15**) konnte auf Proteinebene reproduziert werden. Hierzu wurde eine Ko-Färbung des hepatozytären Filaments CK18 und des mesenchymalen Filaments Desmin mittels Immunfluoreszenz durchgeführt. Unter Kontrollbedingungen konnte das Filament Desmin als typischer HSC-Marker in den kultivierten hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden (**Abb. 18 A**). Nach Behandlung mit 100 nM Crenolanib konnte in hepatischen Sternzellen zudem das Filament CK18 nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich, analog zur CK19-Expression, Ansammlungen CK18-positiver Zellen in verstreut liegenden Zellclustern zwischen undifferenzierten Desmin-positiven hepatischen Sternzellen (**Abb. 18 B, C**). Isolierte Hepatozyten wurden als Positivkontrolle für eine CK18-Expression verwendet (**Abb. 18 D**). Die differenzierenden CK18-positiven hepatischen Sternzellen zeigten weiterhin eine schwache Ko-Expression des mesenchymalen Filaments Desmin als Zeichen ihrer mesenchymalen Abstammung (**Abb. 18 E, F; weiße Pfeile**). Die Induktion eines neuen Expressionsmusters von epithelialen Zellen durch Crenolanib sollte mit dem Rückgang mesenchymaler Eigenschaften in Sternzellen verbunden sein. Tatsächlich fanden sich weitere hepatische Sternzellen, in denen das Filament Desmin nur noch schwach nachweisbar war, die allerdings auch keinen Nachweis von CK18 zeigten. Dies ließ vermuten, dass unterschiedliche Stadien der Entwicklung nebeneinander auftraten.

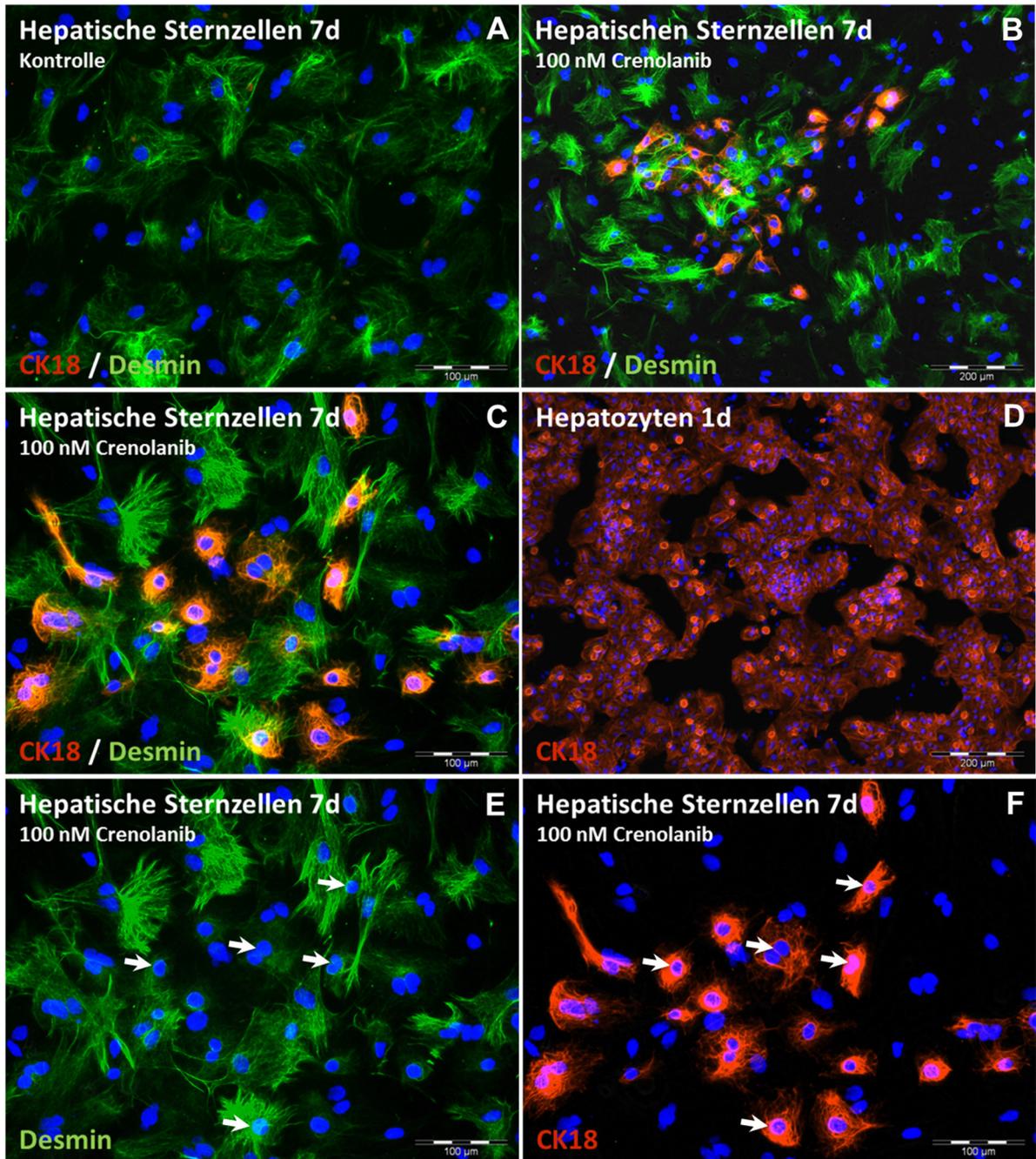


Abbildung 18: Nachweis des Hepatozytenmarkers CK18 in hepatischen Sternzellen nach Behandlung mit Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert; anschließend wurden der Hepatozytenmarker CK18 (rot) sowie der Sternzellmarker Desmin (grün) mittels Immunfluoreszenz gefärbt. In der unbehandelten Kontrolle war das Filament Desmin als Marker hepatischer Sternzellen nachweisbar (A). Die mit 100 nM Crenolanib behandelten hepatischen Sternzellen zeigten deutliche Cluster differenzierender Zellen, die eine starke Färbung von CK18 aufwiesen (B, C). Die Positivkontrolle der Hepatozyten zeigte ebenfalls eine deutliche CK18-Färbung (D). Allerdings konnte auch in den CK18-positiven Zellen nach Crenolanib-Behandlung weiterhin der Sternzellmarker Desmin schwach nachgewiesen werden (weiße Pfeile) (E, F).

In der Immunfluoreszenz zeigte sich analog der qPCR-Analyse auch auf Proteinebene eine Induktion des Progenitorzellmarkers CK19 und des Hepatozytenmarkers CK18 unter Crenolanib-Behandlung in hepatischen Sternzellen.

Veränderung von Markern ruhender und aktivierter hepatischer Sternzellen unter Crenolanib

Neben der mRNA-Expression von hepatozytären Markern wurde auch die mRNA-Expression typischer Marker von ruhenden und aktivierten hepatischen Sternzellen unter Crenolanib-Behandlung analysiert. Hierzu wurde die mRNA-Expression von Desmin, Vimentin, Kollagen 1 α 2 (COL1 α 2), α SMA, PDGFR α und PDGFR β nach siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels qPCR-Analyse untersucht.

Unter Crenolanib-Behandlung konnte ein Rückgang der mRNA-Expression von Desmin, einem klassischen Marker hepatischer Sternzellen, auf das 0,7-fache der unter Kontrollbedingungen gemessenen mRNA-Expression beobachtet werden. Für Vimentin, einen weiteren Marker ruhender hepatischer Sternzellen, konnten wir diesen Rückgang der mRNA-Expression nicht beobachten. Für die Marker aktivierter hepatischer Sternzellen wie COL1 α 2 und α SMA konnten ebenfalls signifikant niedrigere Expressionswerte unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Hierbei zeigten sich unter Kontrollbedingungen für COL1 α 2 und α SMA 1,4-fach bzw. 1,9-fach erhöhte Expressionswerte gegenüber den Expressionswerten unter Crenolanib-Behandlung.

Für die beiden mesenchymalen Marker PDGFR α und PDGFR β , die, wie bereits gezeigt, ebenfalls von ruhenden und aktivierten hepatischen Sternzellen exprimiert werden, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Expression zwischen der Kontrolle und Crenolanib-Behandlung. Es zeigte sich lediglich ein Trend einer geringeren mRNA-Expression des PDGFR β unter Crenolanib, während die mRNA-Expression des PDGFR α im Vergleich zur Kontrolle leicht stieg (**Abb. 19**).

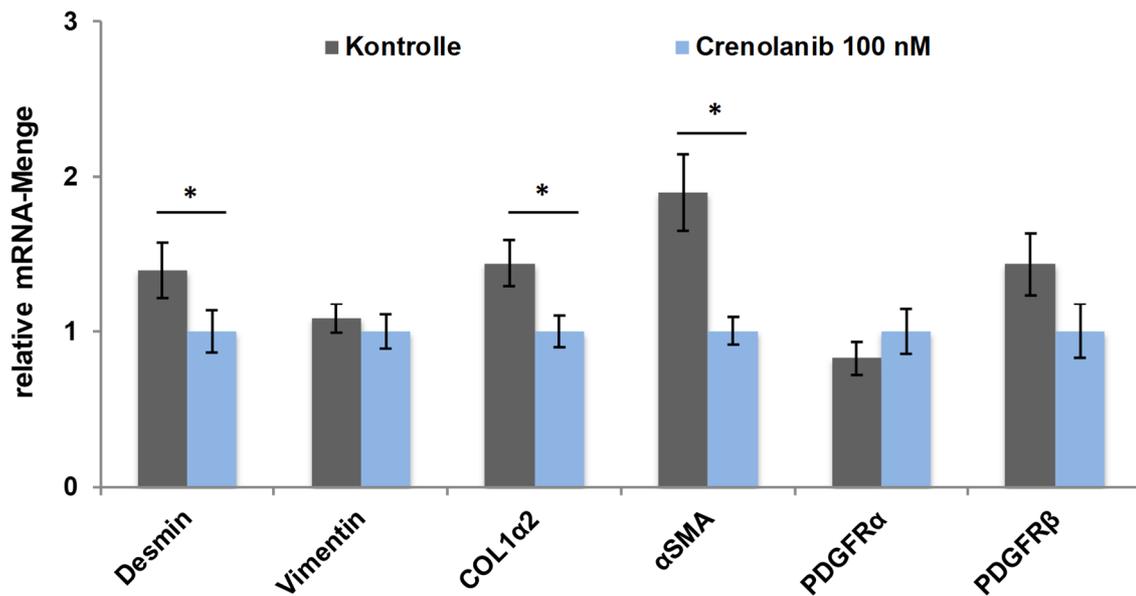


Abbildung 19: Analyse der mRNA-Expression von Markern ruhender und aktivierter hepatischer Sternzellen unter Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden nach Isolierung 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Marker Desmin, Vimentin, COL1α2, αSMA, PDGFRα und PDGFRβ mittels qPCR-Analyse untersucht. Hierbei zeigte sich für Desmin als Marker ruhender hepatischer Sternzellen eine signifikant geringere mRNA-Expression unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Für Vimentin hingegen als auch für die mesenchymalen Marker PDGFRα und PDGFRβ konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe nach Crenolanib-Behandlung und der Kontrolle beobachtet werden. Die mRNA-Expression von COL1α2 und αSMA als Marker aktivierter Sternzellen war jedoch deutlich vermindert unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. (n=4-9; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Unter Induktion einer hepatischen Differenzierung von Sternzellen durch Crenolanib-Behandlung verringerte sich gleichzeitig die mRNA-Expression von Markern ruhender und aktivierter hepatischer Sternzellen.

Nachweis von osteozytären, adipozytären und pankreatischen Markern in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib

Um die Differenzierung unter Crenolanib-Behandlung in hepatischen Sternzellen weiter zu untersuchen und zu überprüfen, ob neben der hepatozytären Differenzierung auch weitere Differenzierungswege induziert werden, wurde die mRNA-Expression des osteozytären Markers Osteocalcin, des adipozytären Markers FABP4 (*fatty acid binding protein 4*) sowie der pankreatischen Marker Insulin und Amylase 2 nach siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib untersucht.

Es konnte ein geringer Anstieg der mRNA-Expression des Markers Osteocalcin unter 100 nM Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Allerdings zeigte sich hier bereits in der Kontrolle eine deutliche mRNA-Expression von Osteocalcin. Für den Marker

FABP4 hingegen zeigte sich eine signifikant geringere mRNA-Expression unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Die mRNA-Expression der pankreatischen Marker Insulin und Amylase 2 zeigte keine signifikante Veränderung nach Behandlung mit Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 20**).

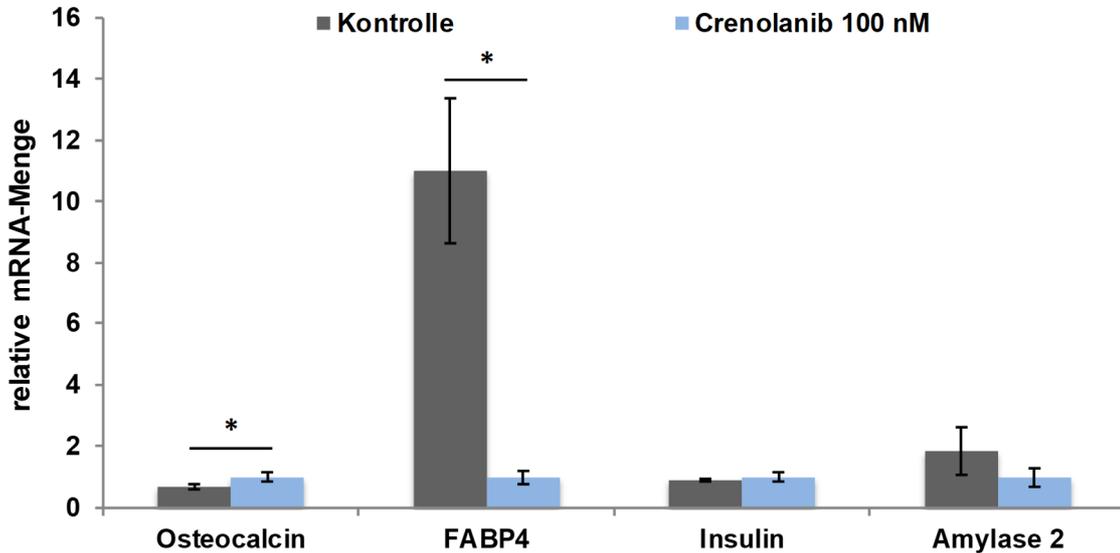


Abbildung 20: Analyse der mRNA-Expression von osteozytären, adipozytären und pankreatischen Markern in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden nach Isolierung 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Marker Osteocalcin, FABP4, Insulin und Amylase 2 mittels qPCR-Analyse untersucht. Unter Crenolanib-Behandlung zeigte sich eine geringe Steigerung der mRNA-Expression von Osteocalcin im Vergleich zur Kontrolle. Die FABP4-Expression zeigte sich hingegen unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringert. Die pankreatischen Marker Insulin und Amylase 2 zeigten sich unbeeinträchtigt unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. (n=3-12; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Insgesamt zeigte sich keine eindeutige Induktion einer osteozytären (Osteocalcin), adipozytären (FABP4) oder pankreatischen Differenzierung (Insulin, Amylase 2). Allerdings zeigte sich interessanterweise unter Crenolanib-Behandlung ein deutlicher Abfall der unter Kontrollbedingungen gemessenen FABP4-Expression.

Analyse der Akt-, ERK1/2- und p38-vermittelten Signalwege unter Crenolanib

Die Phosphorylierung typischer Signaltransduktionsmoleküle des PDGFR-Signalwegs unter Stimulation mit PDGF-BB sowie der Einfluss des Crenolanibs wurden in isolierten Sternzellen mittels Western-Blot-Analyse untersucht.

15 Minuten bzw. 1 Stunde nach Stimulation mit PDGF-BB zeigte sich eine stärkere Phosphorylierung der Akt sowie der MAPK ERK1/2 in hepatischen Sternzellen im Vergleich zur Kontrolle. Ebenfalls konnte 15 Minuten nach Stimulation mit PDGF-BB eine stärkere Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. 1 Stunde nach Stimulation mit PDGF-BB zeigte sich hingegen nur eine schwache Zunahme der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur Kontrolle. Zur Inhibition der PDGFR-vermittelten Signalwege wurden die hepatischen Sternzellen vor Stimulation mit PDGF-BB für 2 Stunden mit Crenolanib (100 nM, 1000 nM) vorbehandelt. Nach Vorbehandlung mit Crenolanib zeigte sich ein deutlich verringerter Anstieg der Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 unter Stimulation mit PDGF-BB sowohl nach 15 Minuten als auch nach 1 Stunde. Ebenso konnte nach Vorbehandlung mit 1000 nM Crenolanib ein verringerter Anstieg der Phosphorylierung der Akt unter Stimulation mit PDGF-BB sowohl nach 15 Minuten als auch nach 1 Stunde gemessen werden. Dabei zeigte alleinige Behandlung mit Crenolanib keine Veränderungen der Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 und nur eine geringe Änderung der Phosphorylierung der Kinase Akt im Vergleich zur Kontrolle. Unter Stimulation mit 1000 nM Crenolanib allein konnte überraschenderweise eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 gemessen werden. Unter Stimulation mit 100 nM Crenolanib war die Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 in hepatischen Sternzellen im Vergleich zur Kontrolle geringer (**Abb. 21**).

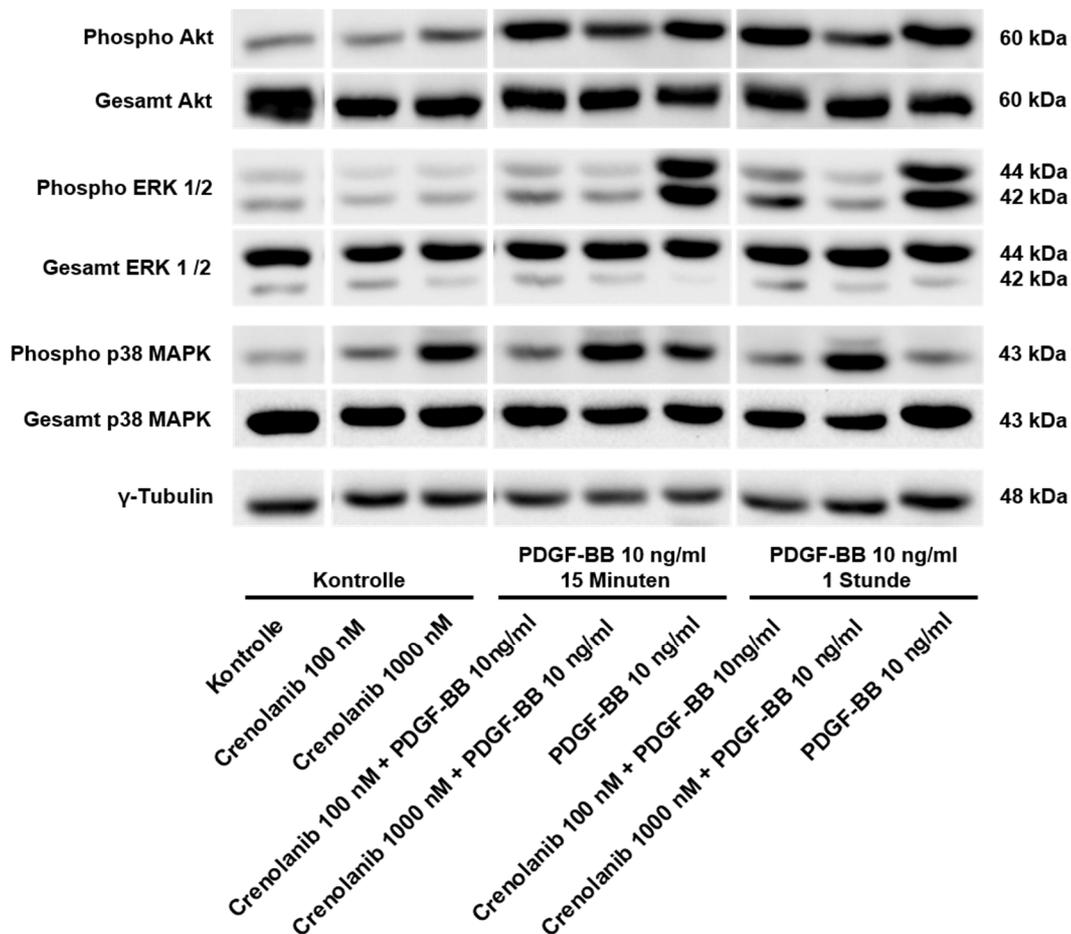


Abbildung 21: Stimulation von hepatischen Sternzellen mit PDGF-BB in An- und Abwesenheit von Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 7 nach Isolierung für 2 Stunden mit 100 nM Crenolanib, 1000 nM Crenolanib oder Kontrollmedium vorbehandelt. Anschließend wurde für 15 Minuten sowie 1 Stunde mit 10 ng/ml PDGF-BB stimuliert. Mittels Western Blot wurde die Phosphorylierung der Signalmoleküle Akt (Ser473), ERK1/2 (Thr202/Tyr204) und p38 (Thr180/Tyr182) analysiert. Unter alleiniger PDGF-BB-Stimulation konnte eine Steigerung der Phosphorylierung von Akt und ERK1/2 im Vergleich zur Kontrolle sowohl nach 15 Minuten als auch nach 1 Stunde Stimulation sowie eine Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur Kontrolle nach 15 Minuten Stimulation gezeigt werden. Nach Vorbehandlung mit 100 nM und 1000 nM Crenolanib zeigte sich unter Stimulation mit PDGF-BB eine schwächere Phosphorylierung der Signalmoleküle Akt und ERK1/2 als unter alleiniger PDGF-BB-Stimulation. Erstaunlicherweise zeigte sich unter Behandlung mit 1000 nM Crenolanib allein eine Phosphorylierung der MAPK p38 und nach zusätzlicher Stimulation mit PDGF-BB eine stärkere Phosphorylierung der MAPK p38 als bei alleiniger Stimulation mit PDGF-BB. (Die Abbildung zeigt einen charakteristischen Western Blot als Auswahl der n=3 durchgeführten Western Blots.)

Die Phosphorylierung der Signalmoleküle Akt, ERK1/2 und p38 unter Stimulation mit PDGF-BB und Crenolanib wurde durch eine densitometrische Analyse quantifiziert. Dabei konnte eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der Proteinkinase Akt nach 15 Minuten PDGF-BB-Stimulation bei Vorbehandlung mit 100 nM Crenolanib oder 1000 nM Crenolanib auf das 0,85-fache bzw. 0,6-fache des Ausgangswerts unter alleiniger PDGF-BB-Behandlung festgestellt werden. Ebenso wurde eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 nach 15 Minuten PDGF-BB-Stimulation bei

Vorbehandlung mit 100 nM Crenolanib oder 1000 nM Crenolanib auf das 0,3-fache bzw. 0,2-fache des Ausgangswerts unter alleiniger PDGF-BB-Behandlung gemessen. Darüber hinaus wurde eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der MAPK p38 nach 15 Minuten Stimulation mit PDGF-BB und Vorbehandlung mit 100 nM Crenolanib auf das 0,6-fache des Ausgangswerts unter alleiniger PDGF-BB-Behandlung festgestellt. Unter Vorbehandlung mit 1000 nM Crenolanib und anschließender Stimulation mit PDGF-BB konnte hingegen eine Steigerung der Phosphorylierung auf das 2,2-fache des Ausgangswerts unter PDGF-BB allein gemessen werden (**Abb. 22**).

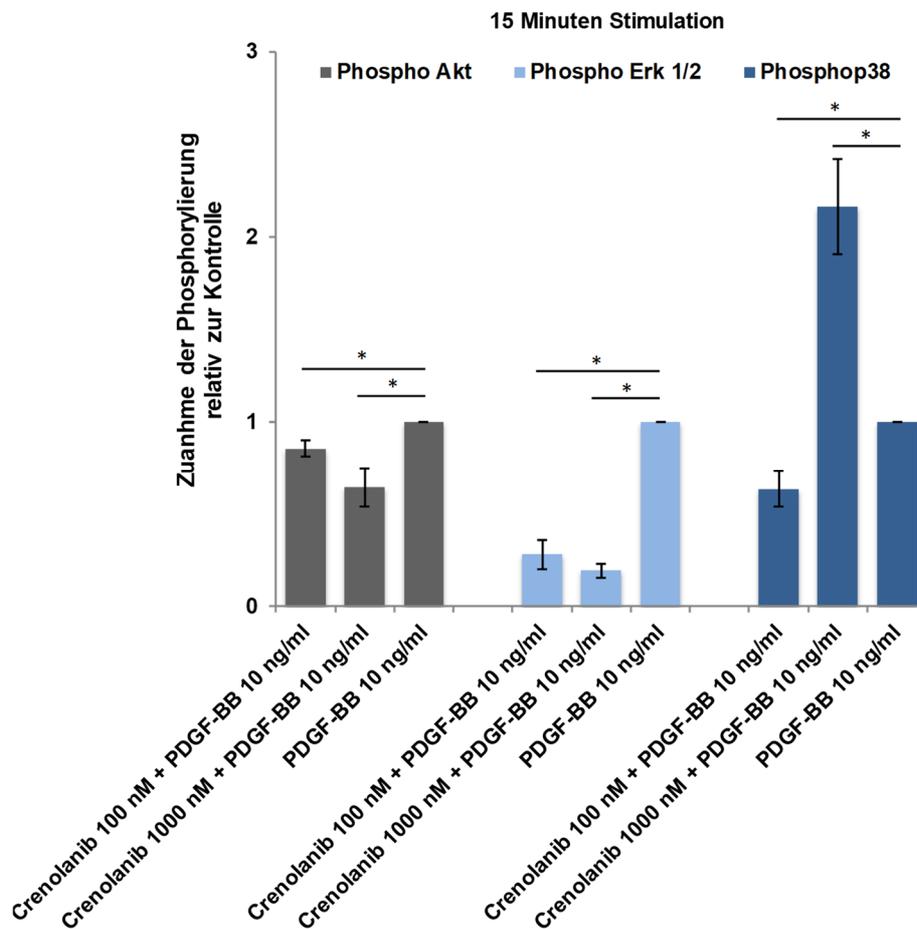


Abbildung 22: Densitometrie der Western-Blot-Analysen von hepatischen Sternzellen nach Stimulation mit PDGF-BB in An- und Abwesenheit von Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 7 nach Isolierung für 2 Stunden mit 100 nM Crenolanib, 1000 nM Crenolanib oder Kontrollmedium vorbehandelt. Danach wurde für 15 Minuten mit 10 ng/ml PDGF-BB stimuliert. Die densitometrische Auswertung zeigte bei einer Vorbehandlung mit 100 nM Crenolanib eine Reduktion der Phosphorylierung der Akt, der MAPK ERK1/2 sowie der MAPK p38 nach 15-minütiger PDGF-BB-Stimulation im Vergleich zur alleinigen PDGF-BB-Stimulation. Nach Vorbehandlung mit 1000 nM Crenolanib zeigte sich im Vergleich zu 100 nM Crenolanib eine stärkere Reduktion der Phosphorylierung der Akt sowie der MAPK ERK1/2 nach 15-minütiger PDGF-BB-Stimulation im Vergleich zur alleinigen PDGF-BB-Stimulation. Erstaunlicherweise konnte unter 1000 nM Crenolanib ebenfalls eine Phosphorylierung der MAPK p38 beobachtet werden, die durch Behandlung mit PDGF-BB zusätzlich gesteigert wurde. (n=3; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Zusammenfassend konnte Crenolanib die Phosphorylierung besonders der MAPK ERK1/2 und in geringerem Maße der Kinase Akt unter PDGF-BB-Stimulation reduzieren. Die Phosphorylierung der MAPK p38 unter PDGF-BB-Stimulation wurde hingegen durch hohe Konzentrationen Crenolanib nicht reduziert, sondern im Gegenteil führte die Behandlung mit 1000 nM Crenolanib allein zu einer von PDGF-BB unabhängigen Phosphorylierung der MAPK p38.

Phosphorylierung der MAPK p38 unter Crenolanib

Die Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 hepatischer Sternzellen durch Behandlung mit Crenolanib wurde genauer untersucht. Hierzu wurden hepatische Sternzellen mit 10 nM, 100 nM und 1000 nM Crenolanib für 15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde stimuliert und anschließend die Phosphorylierung der MAPK p38 mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Nach Stimulation mit 1000 nM Crenolanib konnte zu allen Zeitpunkten eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (**Abb. 23**). Die densitometrische Auswertung zeigte nach 15 Minuten Stimulation mit 1000 nM Crenolanib eine Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 auf das 4,5-fache, nach 1 Stunde eine Steigerung auf das 5,3-fache und nach 30 Minuten eine Steigerung auf das 7,9-fache des Ausgangswerts der Kontrolle. Nach 15 Minuten Stimulation mit 10 nM und 100 nM Crenolanib konnte ebenfalls eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Hierbei konnte ein Anstieg der Phosphorylierung auf das 1,3-fache bzw. 1,5-fache des Kontrollwerts gemessen werden. Für die späteren Stimulationszeitpunkte (30 Minuten, 1 Stunde) konnte keine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 unter Behandlung mit 10 nM und 100 nM Crenolanib gezeigt werden (**Abb. 23**).

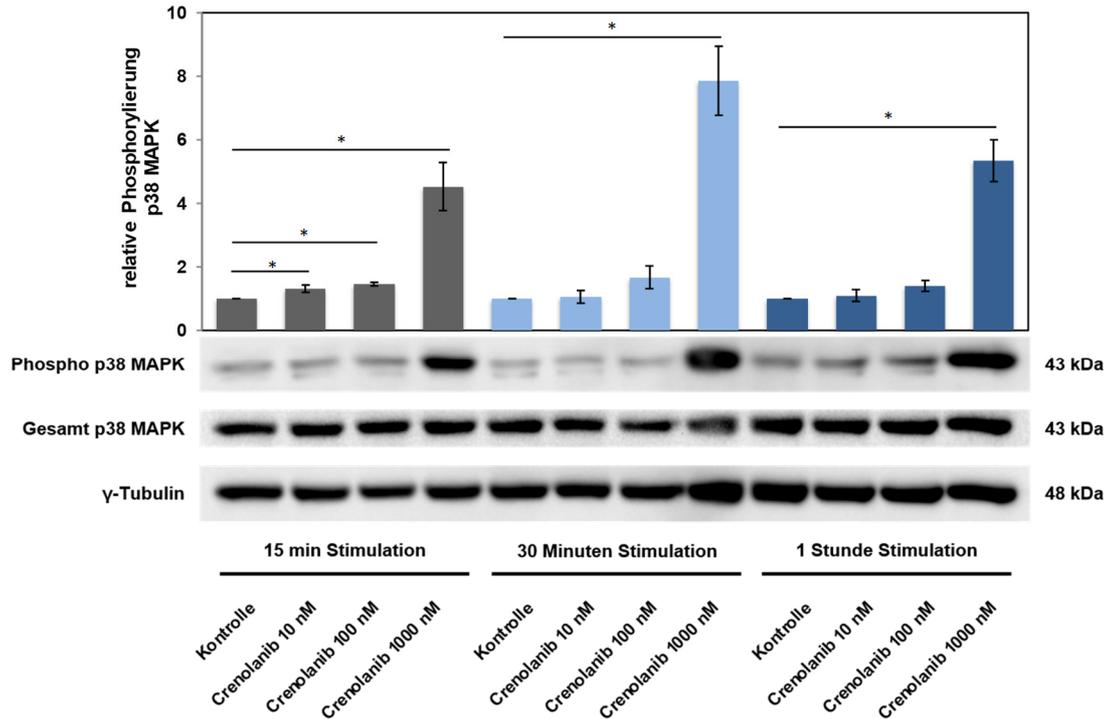


Abbildung 23: Phosphorylierung der MAPK p38 unter Stimulation von hepatischen Sternzellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage nach Isolierung für 15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde mit 10 nM, 100 nM und 1000 nM Crenolanib stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung der MAPK p38 (Thr180/Tyr182) mittels Western-Blot-Analyse untersucht und densitometrisch ausgewertet. Unter Stimulation mit 1000 nM Crenolanib zeigte sich eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die densitometrische Auswertung zeigte unter Stimulation mit 1000 nM Crenolanib eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu allen gemessenen Zeitpunkten. Dabei zeigte sich nach 15 Minuten ein Anstieg um das 4,5-fache, nach 30 Minuten ein Anstieg um das 7,9-fache und nach 1 Stunde ein Anstieg um das 5,3-fache des Kontrollwerts. Stimulation mit Crenolanib in den Konzentrationen 10 nM und 100 nM zeigte nur einen schwachen Anstieg der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Für Behandlung mit 10 nM und 100 nM Crenolanib konnte nur für den 15 min Stimulationszeitpunkt Signifikanz gezeigt werden. (Die Abbildung zeigt einen charakteristischen Western Blot als Auswahl der n=3 durchgeführten Western Blots; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Einfluss der Phosphorylierung der MAPK p38 auf die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib

Um den Einfluss der Phosphorylierung der MAPK p38 auf die Induktion von Progenitorzell- sowie Hepatozytenmarkern unter Crenolanib zu untersuchen, wurden die Zellen zusätzlich mit SB203580, einem Inhibitor der p38 Phosphorylierung, behandelt. Zunächst wurde untersucht, ob die unter Crenolanib beobachtete Phosphorylierung der MAPK p38 durch Behandlung mit SB203580 ausreichend inhibiert wird. Hierzu wurden hepatische Sternzellen an Tag 7 nach Isolierung entweder 2 Stunden mit Grundmedium oder mit 1000 nM SB203580 vorbehandelt und anschließend mit 1000 nM Crenolanib für 15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde stimuliert. Als Kontrollgruppe wurden hepatische Sternzellen 2 Stunden mit 1000 nM SB203580 behandelt und anschließend mit DMSO im Verhältnis 1:10000 im Medium stimuliert. Unter Crenolanib-Stimulation zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung der MAPK p38 zu allen Zeitpunkten im Vergleich zur Kontrolle. Nach zweistündiger Vorbehandlung mit SB203580 zeigte sich in den Western-Blot-Analysen eine verringerte Phosphorylierung der MAPK p38 unter Stimulation mit Crenolanib (**Abb. 24**). Zur Quantifizierung der reduzierten Phosphorylierung wurden die Daten densitometrisch analysiert.

In der densitometrischen Auswertung zeigte sich nach zweistündiger Vorbehandlung mit 1000 nM SB203580 nach 15 Minuten Stimulation mit 1000 nM Crenolanib keine Reduktion der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zur alleinigen Crenolanib-Stimulation. Nach 30 Minuten Stimulation mit 1000 nM Crenolanib zeigte sich unter Vorbehandlung mit SB203580 eine Reduktion auf das 0,6-fache des Werts unter alleiniger Crenolanib-Stimulation, allerdings konnte keine Signifikanz gezeigt werden. Nach Vorbehandlung mit SB203580 zeigte sich 1 Stunde nach Stimulation mit 1000 nM Crenolanib eine signifikante Reduktion der Phosphorylierung der MAPK p38 auf das 0,6-fache des Werts unter alleiniger Crenolanib-Stimulation (**Abb. 24**).

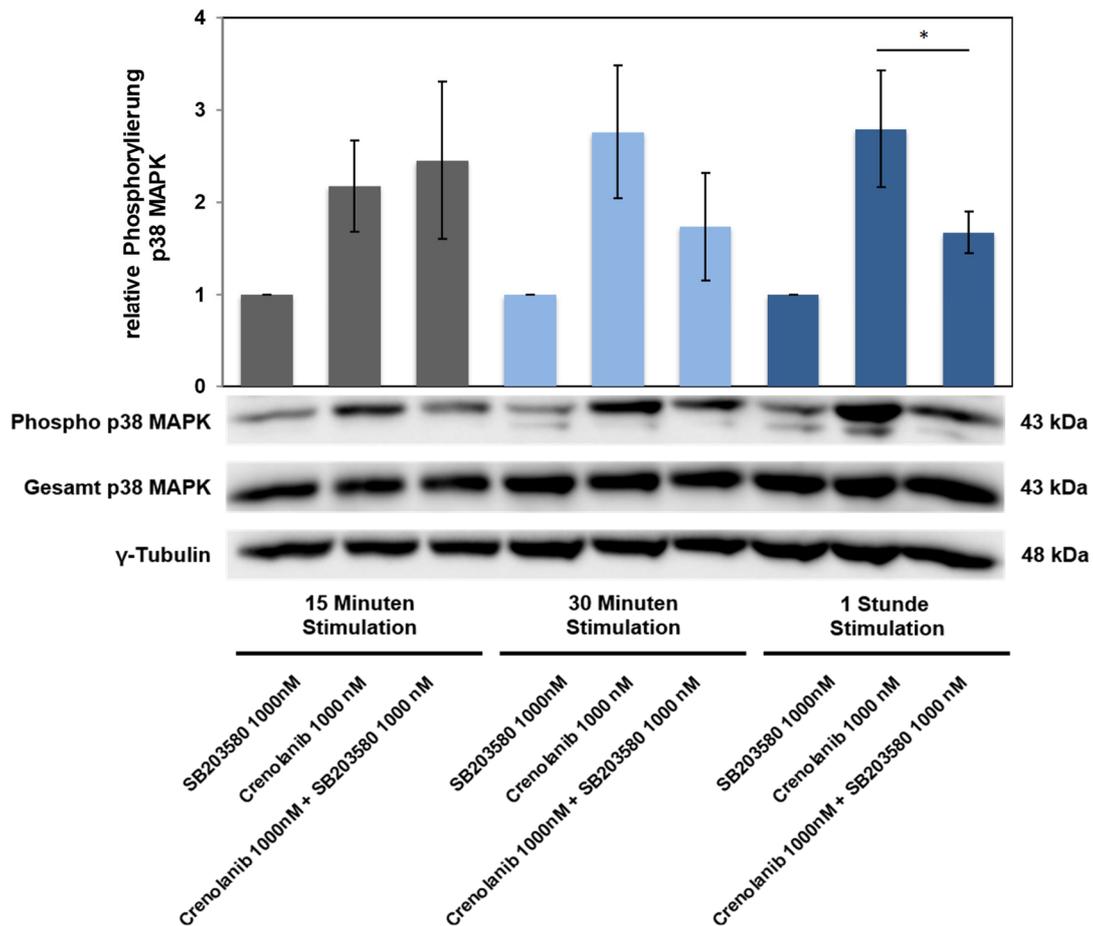


Abbildung 24: Phosphorylierung der MAPK p38 unter Crenolanib-Stimulation allein und nach Vorbehandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 7 nach Isolierung mit normalem Medium oder mit 1000 nM SB203580 für 2 Stunden inkubiert und danach für 15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde mit 1000 nM Crenolanib stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung der MAPK p38 (Thr180/Tyr182) mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Durch Vorinkubation mit SB203580 konnte nach Stimulation mit Crenolanib eine Verringerung der Phosphorylierung der MAPK p38 im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen beobachtet werden. Die densitometrische Auswertung zeigte für den Stimulationszeitpunkt nach 15 Minuten keine Reduktion der Phosphorylierung unter Crenolanib nach Vorbehandlung mit SB203580. Zu den Zeitpunkten 30 Minuten und 1 Stunde zeigte sich jedoch eine Reduktion der Phosphorylierung der MAPK p38 unter Crenolanib nach Vorbehandlung mit SB203580 auf das 0,6-fache des Ausgangswerts. Für den Stimulationszeitpunkt 1 Stunde waren die Veränderungen der p38-Phosphorylierung signifikant. (Die Abbildung zeigt einen charakteristischen Western Blot als Auswahl der n=3 durchgeführten Western Blots; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der Inhibition der Phosphorylierung der MAPK p38 auf die mRNA-Expression von Progenitorzell- sowie Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib-Stimulation untersucht. Hierzu wurden hepatische Sternzellen 7 Tage mit 100 nM Crenolanib bzw. einer Kombination von 100 nM Crenolanib und 1000 nM SB203580 behandelt. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Marker CK19, EpCAM und CK18 in beiden Versuchsgruppen gemessen.

Unter alleiniger siebentägiger Crenolanib-Behandlung konnte eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von CK19, EpCAM und CK18 im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Bei kombinierter Behandlung mit 1000 nM SB203580 und 100 nM Crenolanib konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expressionswerte der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM auf das 0,4-fache bzw. 0,1-fache der mRNA-Expressionswerte unter alleiniger Crenolanib-Stimulation gemessen werden. Für den Marker CK18 konnte unter gleichzeitiger Behandlung mit Crenolanib und SB203580 keine Änderung der mRNA-Expression im Vergleich zur alleinigen Crenolanib-Behandlung gemessen werden. (**Abb. 25**).

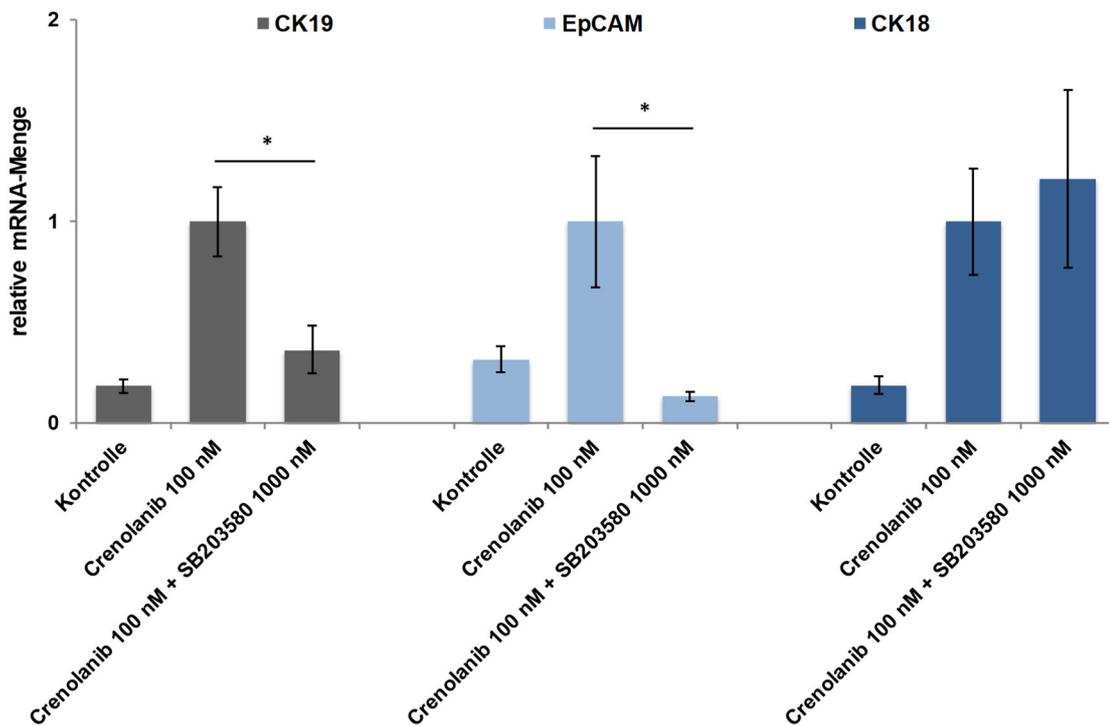


Abbildung 25: Einfluss der Inhibition der Phosphorylierung der MAPK p38 durch den Inhibitor SB203580 auf die mRNA-Expression von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib bzw. 100 nM Crenolanib in Kombination mit 1000 nM SB203580 inkubiert, um die Phosphorylierung von p38 zu inhibieren. Mittels qPCR wurde die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM sowie des Hepatozytenmarkers CK18 analysiert. Während durch Zugabe von SB203580 der Anstieg der mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM unter Crenolanib-Behandlung signifikant erniedrigt wurde, konnte keine signifikante Reduktion der mRNA-Expression des Hepatozytenmarkers CK18 gemessen werden. (n=4; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Zusammenfassend zeigte sich, dass ein Teil der durch Crenolanib induzierten mRNA-Expression von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen durch eine Phosphorylierung der MAPK p38 vermittelt wird.

Veränderung autokriner und parakriner Wachstumsfaktoren sowie ihrer Rezeptoren in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib

Zur weiteren Aufklärung der Mechanismen, die zur Induktion einer hepatischen Differenzierung in Sternzellen unter Crenolanib-Behandlung führen, wurde die mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren untersucht, für die in der Literatur eine Beteiligung an der Differenzierung von Stammzellen zu Hepatozyten beschrieben wurde. Hierzu wurde mittels qPCR die mRNA-Expression von HGF, EGF, FGF 1/2/7/10/15 und Activin A in Sternzellen unter Crenolanib analysiert. Zudem wurde die mRNA-Expression der mitogenen Wachstumsfaktoren und Liganden des PDGFR β , PDGF-BB und PDGF-DD untersucht. Es konnte eine signifikant höhere mRNA-Expression von HGF, FGF7, FGF10 und FGF15 in hepatischen Sternzellen nach 7 Tagen Behandlung mit 100 nM Crenolanib im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen gemessen werden. Hierbei wies HGF einen Anstieg auf das 1,7-fache, FGF15 einen Anstieg auf das 2,4-fache und FGF10 einen Anstieg auf das 4,4-fache der mRNA-Expression der Kontrolle auf. Der größte Anstieg wurde für FGF7 gemessen; hier zeigte sich eine 9,4-fach höhere mRNA-Expression als unter Kontrollbedingungen (**Abb. 26**). Dagegen wurde eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von FGF1 unter Crenolanib-Behandlung auf das 0,2-fache der mRNA-Expression der Kontrolle gemessen. Auch für den Wachstumsfaktor PDGF-BB konnte unter Crenolanib-Behandlung eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression auf das 0,2-fache des Kontrollwerts festgestellt werden (**Abb. 26**). Für die Marker EGF, FGF2, Activin A und PDGF-DD konnten keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expressionswerte unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (**Abb. 26**).

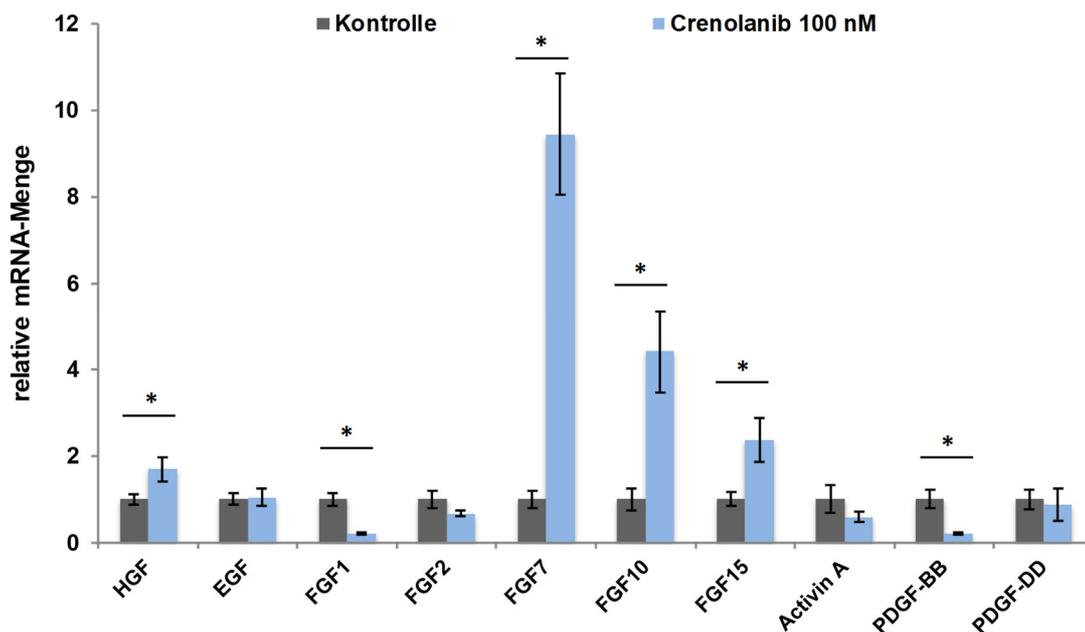


Abbildung 26: Untersuchung der mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren unter Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert. Anschließend wurde die mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren unter Behandlung mit Crenolanib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels qPCR bestimmt. Für HGF und FGF7/10/15 wurde eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression unter Crenolanib im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Die höchste mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle wurde dabei für FGF7 gemessen. Für FGF1 und PDGF-BB hingegen konnte eine signifikant geringere mRNA-Expression unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Für EGF, FGF2, Activin A sowie PDGF-DD wurden keine signifikanten Veränderungen unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen. (n=6; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Ebenfalls wurde die mRNA-Expression der Rezeptoren cMet, FGFR2 und FGFR4 als Rezeptoren der Wachstumsfaktoren HGF, FGF7 und FGF15 untersucht. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression der beiden Rezeptoren cMet und FGFR2 unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Für FGFR4 konnte hingegen keine signifikante Änderung der mRNA-Expression unter Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (**Abb. 27**).

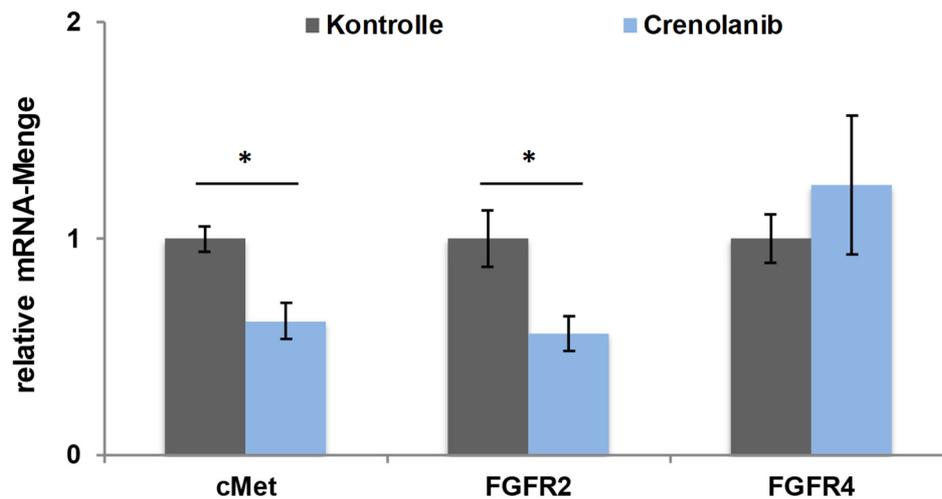


Abbildung 27: Untersuchung der mRNA-Expression der Rezeptoren der Wachstumsfaktoren HGF, FGF7 und FGF15 unter Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Rezeptoren cMet, FGFR2 und FGFR4 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mittels qPCR gemessen. Für den Rezeptor von HGF (cMet) sowie den Rezeptor von FGF7 (FGFR2) wurde eine signifikante Verringerung der mRNA-Expression unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die mRNA-Expression des Rezeptors von FGF 15 (FGFR4) hingegen wurde durch Crenolanib-Behandlung nicht signifikant verändert. (n=5-7; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Insgesamt zeigten unter Crenolanib verschiedene Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren mit potentielltem Einfluss auf das Differenzierungsverhalten hepatischer Sternzellen eine veränderte mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib

Im weiteren Verlauf wurde der Einfluss der unter Crenolanib differentiell exprimierten Wachstumsfaktoren (**Abb. 26**) auf hepatische Sternzellen untersucht. Hierzu wurden hepatische Sternzellen mit den Wachstumsfaktoren FGF1, FGF7, HGF und FGF 15 für 7 Tage behandelt und anschließend der Einfluss auf die Entwicklung der Zellen untersucht.

Da FGF1 als potenter Wachstumsfaktor für verschiedene Zelltypen bekannt ist, untersuchten wir das Proliferationsverhalten hepatischer Sternzellen unter Stimulation mit FGF1. Hierzu wurden hepatische Sternzellen nach Isolierung für 72 Stunden mit 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml FGF1 inkubiert und anschließend die Zellzahl mittels Proliferationsmessung (Zellzählung nach Trypsinablösung) je Ansatz ermittelt. Dabei konnte eine Proliferationssteigerung der kultivierten hepatischen Sternzellen unter FGF1-Stimulation beobachtet werden. Unter 10 ng/ml FGF1 konnte eine 1,3-fach höhere Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Allerdings konnte keine Signifikanz gezeigt werden. Unter

20 ng/ml FGF1 konnte eine signifikante Steigerung der Zellzahl auf das 1,6-fache der Zellzahl der Kontrolle beobachtet werden (**Abb. 28**).

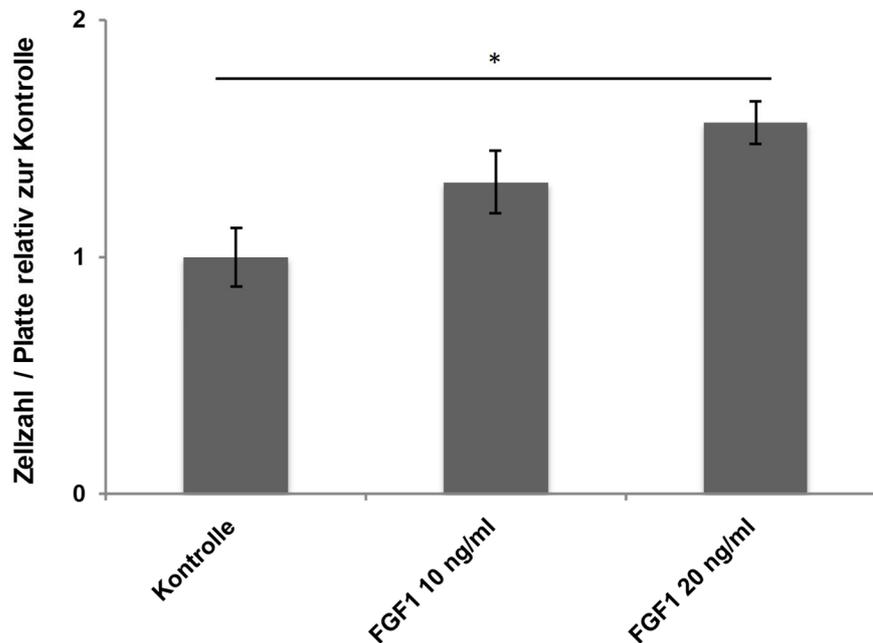


Abbildung 28: Einfluss des Wachstumsfaktors FGF1 auf die Proliferation von hepatischen Sternzellen. Hepatische Sternzellen wurden an Tag 1 nach Isolierung für 72 Stunden mit 10 ng/ml bzw. 20 ng/ml FGF1 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsin-Behandlung abgelöst, um die Zellzahl im Hämocytometer nach Neubauer zu messen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle unter Stimulation mit 20 ng/ml FGF1. (n=4; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Da unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von FGF1 in hepatischen Sternzellen beobachtet werden konnte, untersuchten wir, ob umgekehrt eine Kombination von Crenolanib und 10 ng/ml FGF1 die mRNA-Expressionssteigerung von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib inhibiert. Hierzu wurde nach siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib, 10 ng/ml FGF1 sowie einer Kombination beider Faktoren die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM sowie des Hepatozytenmarkers CK18 gemessen. Hier zeigte sich wie bereits in den früheren Experimenten (**Abb. 15**) eine Steigerung der mRNA-Expression der Marker CK19, EpCAM und CK18 unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Unter alleiniger Stimulation mit FGF1 konnte keine Änderung der mRNA-Expression der untersuchten Marker im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Unter gemeinsamer Stimulation mit Crenolanib und FGF1 zeigten sich geringere mRNA-Expressionswerte der Marker CK19, EpCAM und CK18 im Vergleich zu den mRNA-Expressionswerten der alleinigen Crenolanib-Behandlung. Allerdings konnte keine Signifikanz gezeigt werden. (**Abb. 29**).

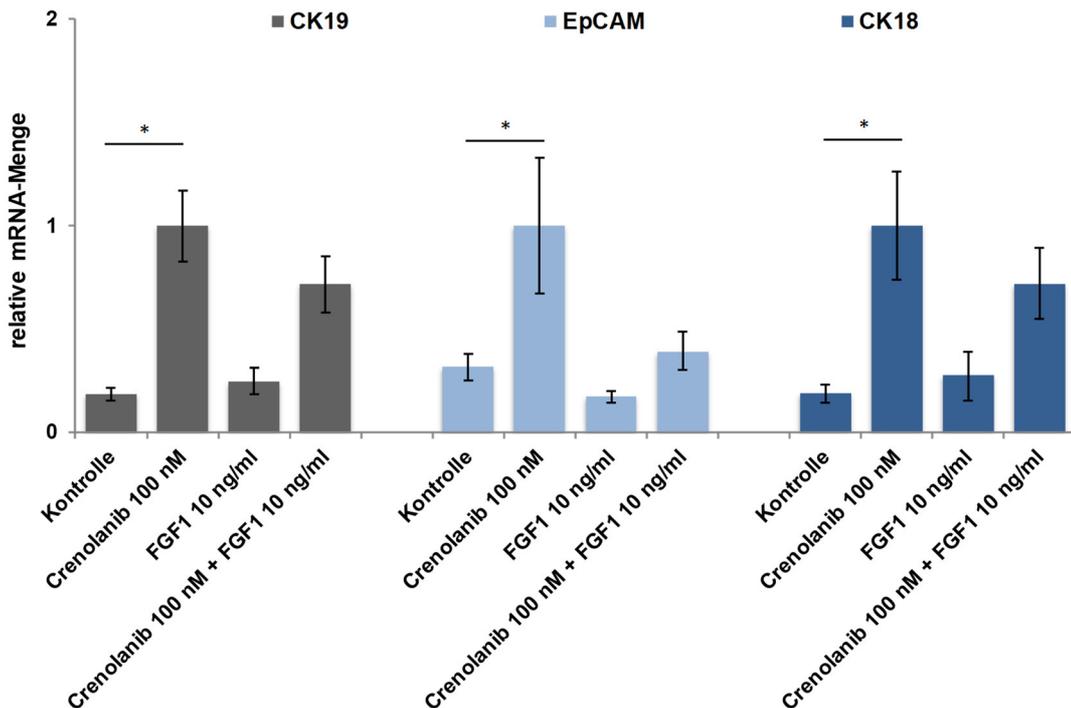


Abbildung 29: Einfluss des Wachstumsfaktors FGF1 auf die mRNA-Expression von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib allein und in Kombination mit 10 ng/ml FGF1 inkubiert. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM sowie des Hepatozytenmarkers CK18 mittels qPCR gemessen. Die Expressionswerte von CK19, EpCAM und CK18 wurden unter Crenolanib-Stimulation bei gleichzeitiger Zugabe von FGF1 verringert, wobei jedoch keine Signifikanz gezeigt werden konnte. (n=6; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Um den Einfluss des Wachstumsfaktors FGF7 auf hepatische Sternzellen zu untersuchen, wurden hepatische Sternzellen für 7 Tage mit 50 ng/ml FGF7 behandelt. Anschließend wurde die mRNA-Expression der Marker CK19, EpCAM und CK18 unter Stimulation mit FGF7 mit der mRNA-Expression in Kontrollen und unter 100 nM Crenolanib verglichen. Dabei konnte nach Behandlung mit 50 ng/ml FGF7 eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression von CK19 und EpCAM im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden, nicht jedoch von CK18. Die Steigerung der mRNA-Expression von CK19 war jedoch unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle 2,9-fach höher als die Steigerung der mRNA-Expression unter FGF7-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Für den Marker EpCAM konnte unter FGF7-Behandlung und Crenolanib-Behandlung eine ähnliche Steigerung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Nur die Behandlung mit Crenolanib zeigte eine Steigerung mRNA-Expression von CK18 im Vergleich zur Kontrolle (**Abb. 30**).

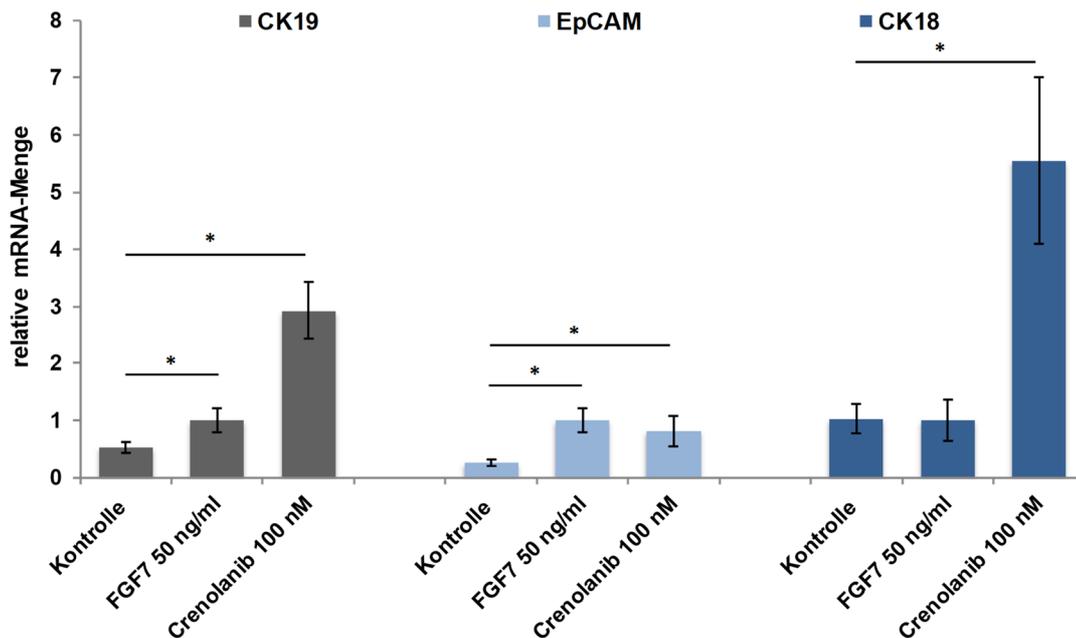


Abbildung 30: Einfluss des Wachstumsfaktors FGF7 auf die mRNA-Expression von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 50 ng/ml FGF7 inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Marker CK19, EpCAM, und CK18 im Vergleich zur mRNA-Expression unbehandelter Kontrollen und siebentägiger Behandlung mit 100 nM Crenolanib mittels qPCR-Analyse bestimmt. Dabei zeigte sich eine Steigerung der mRNA-Expression von CK19, EpCAM und CK18 unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Unter Behandlung mit FGF7 konnte eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden, allerdings veränderte sich die mRNA-Expression des Hepatozyten-Markers CK18 im Vergleich zur Kontrolle nicht. (n=3; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Der Einfluss der Wachstumsfaktoren HGF und FGF15 auf hepatische Sternzellen wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden hepatische Sternzellen für 7 Tage mit 50 ng/ml HGF bzw. 50 ng/ml FGF15 behandelt und anschließend die mRNA-Expression der Marker CK19, EpCAM und CK18 mittels qPCR analysiert. Im Gegensatz zu hepatischen Sternzellen die mit 100 nM Crenolanib behandelt wurden, konnte sowohl unter HGF-Behandlung als auch unter FGF15-Behandlung keine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der drei Gene im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (**Abb. 31**).

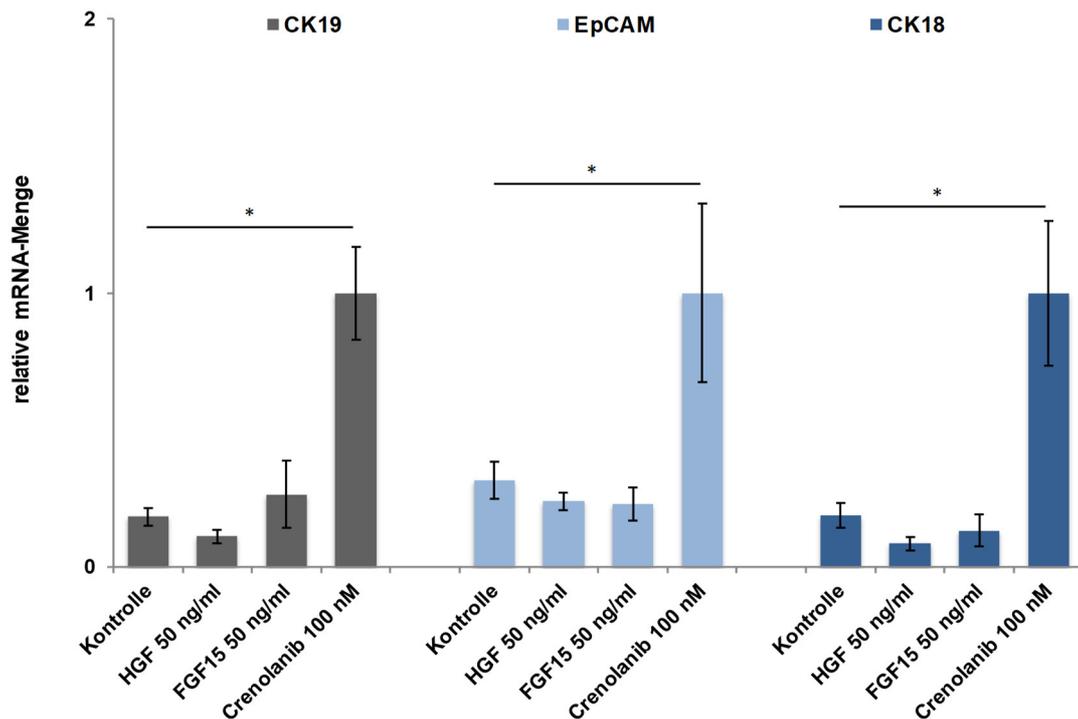


Abbildung 31: Einfluss der Wachstumsfaktoren HGF und FGF15 auf die mRNA-Expression von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern in hepatischen Sternzellen. Hepatische Sternzellen wurden 7 Tage mit 100 nM Crenolanib sowie mit 50 ng/ml HGF oder 50 ng/ml FGF15 inkubiert. Unter Crenolanib konnte eine Induktion der Progenitorzellmarker CK19, EpCAM sowie des Hepatozytenmarkers CK18 beobachtet werden. Durch alleinige Behandlung mit HGF oder FGF15 konnte dieser Anstieg der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle nicht beobachtet werden. (n=4; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Insgesamt konnte nur für den Wachstumsfaktor FGF7 aufgrund der verstärkten mRNA-Expression von Progenitorzellmarkern ein positiver Einfluss auf die Differenzierung hepatischer Sternzellen nachgewiesen werden.

Nachweis von Progenitorzellmarkern in der Zelllinie WB-F344

Die Zelllinie WB-F344 wurde als Zelllinie mit dem Phänotyp und den Eigenschaften von Hepatozytenvorläuferzellen, den sogenannten Ovalzellen in Nagern, charakterisiert ¹⁹¹.

Lichtmikroskopisch zeigten die Ovalzellen ein Anwachsen in epithelialen Verbänden mit deutlichen Zell-Zell-Grenzen und einem polaren Zellaufbau (**Abb. 32 A**). Mittels Immunfluoreszenz wurden verschiedene Marker von hepatischen Progenitorzellen nachgewiesen. So konnten die Progenitorzellmarker AFP und CK19 in allen Zellen der Zelllinie WB-F344 nachgewiesen werden (**Abb. 32 B, C**). Allerdings zeigte sich das normalerweise filamentäre Protein CK19 globulär verteilt im Zytoplasma der Zellen (**Abb. 32 C**). Zudem konnte der mesenchymale Marker PDGFR β in den Zellen der Zelllinie WB-F344 nachgewiesen werden (**Abb. 32 D**).

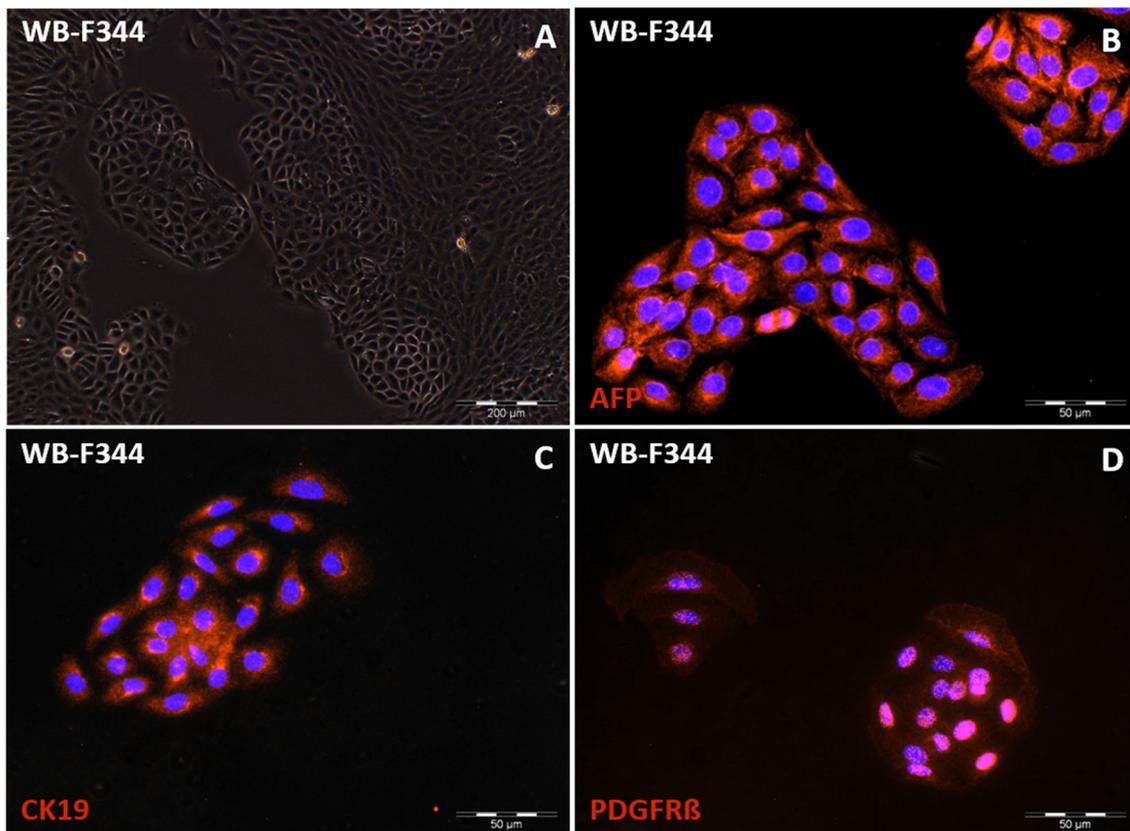


Abbildung 32: Charakterisierung der Ovalzelllinie WB-F344 mittels Immunfluoreszenz. Zellen der Ovalzelllinie WB-F344 zeigten während ihrer Kultivierung eine epitheliale Morphologie mit scharf abgrenzbaren Zell-Zell-Grenzen und klonalem Wachstum (A). Mittels Immunfluoreszenz konnten die typischen Progenitorzellmarker AFP und CK19 in allen Zellen der WB-F344-Linie nachgewiesen werden (B, C). Zudem konnte der mesenchymale Marker PDGFR β in allen Zellen der WB-F344-Linie nachgewiesen werden (D).

Die Zellen der Zelllinie WB-F344 zeigten in der Immunfluoreszenz ein Expressionsmuster von Progenitorzellen der Leber und zudem einen deutlichen Nachweis von PDGFR β .

Nachweis von Hepatozytenmarkern in Zellen der Linie WB-F344 unter Crenolanib

Da Ovalzellen als Vorläuferzellen von Hepatozyten in Nagern beschrieben wurden^{68,69}, untersuchten wir, ob Crenolanib analog zum Effekt auf hepatische Sternzellen eine Induktion der hepatischen Differenzierung in Zellen der Zelllinie WB-F344 bewirkt. Hierzu wurden WB-F344-Zellen 7 Tage mit 100 nM Crenolanib behandelt und anschließend die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker CK19 und AFP sowie der Hepatozytenmarker CK18, HNF4 α und Albumin untersucht. Hierbei konnte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der Marker CK19 und AFP beobachtet werden. Diese für Progenitorzellen typischen Marker wurden allerdings schon vor Behandlung mit Crenolanib unter Kontrollbedingungen von den Zellen deutlich exprimiert.

Ebenso konnte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der Marker CK18 und Albumin unter Behandlung mit Crenolanib beobachtet werden. Für den Marker HNF4 α konnte nach siebentägiger Behandlung mit Crenolanib eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (**Abb. 33**).

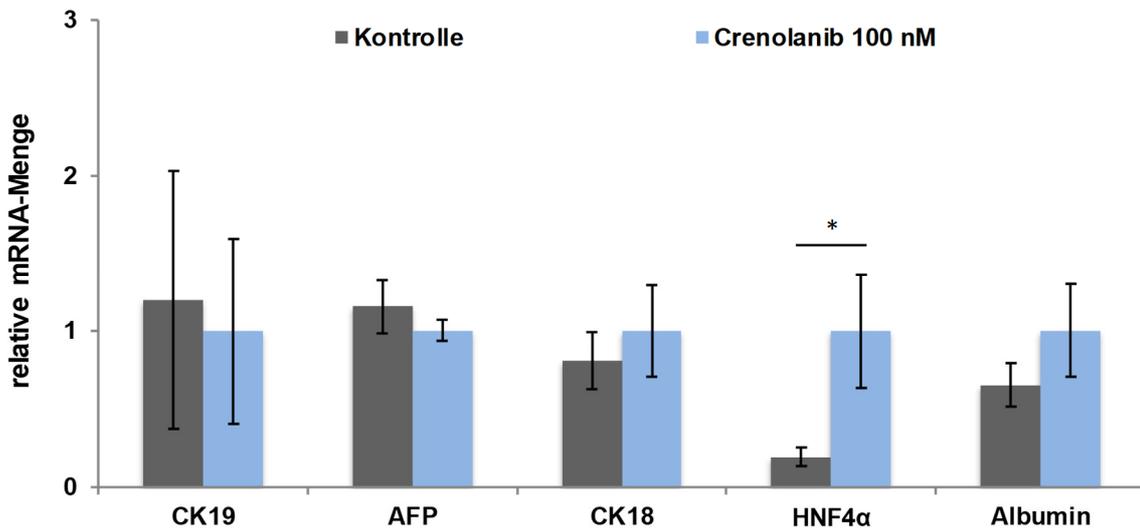


Abbildung 33: Einfluss von Crenolanib auf die mRNA-Expression von Hepatozytenmarkern in WB-F344 Zellen. Zellen der Linie WB-F344 wurden unter serumfreien Bedingungen für 7 Tage mit 100 nM Crenolanib inkubiert und anschließend die mRNA-Expression der Hepatozytenmarker CK18, HNF4 α und Albumin mittels qPCR gemessen. Es konnte keine signifikante Steigerung der mRNA-Expression der Marker CK18 und Albumin unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Für den Hepatozytenmarker HNF4 α konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression unter Crenolanib-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. (n=3; Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.)

Insgesamt zeigten sich in der Progenitorzelllinie WB-F344 Hinweise auf eine Induktion einer hepatischen Differenzierung, wenngleich diese vor allem bei den Progenitorzellmarkern wie CK19 und AFP nicht zum Ausdruck kam.

Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die PDGF-Rezeptoren α und β von ruhenden und aktivierten hepatischen Sternzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* exprimiert werden und dass insbesondere der PDGFR β und seine Liganden während der stammzellbasierten Leberregeneration im Bereich der duktilären Reaktion in aktivierten hepatischen Sternzellen vermehrt exprimiert werden.

In vitro-Studien zeigten eine verstärkte Proliferation hepatischer Sternzellen unter Stimulation mit den Liganden PDGF-BB und PDGF-DD. Der Tyrosin-Kinaseinhibitor Crenolanib konnte diese durch PDGF-Liganden vermittelte Proliferation effektiv inhibieren. Gleichzeitig zeigte sich unter Crenolanib-Behandlung eine verstärkte DNA-Synthese in hepatischen Sternzellen, die nicht durch Zellproliferation, sondern durch einen Anstieg der Zellkerne pro Zelle erklärt werden konnte. Mit dieser Steigerung der DNA-Synthese ging eine Induktion einer hepatischen Differenzierung in den Kulturen der Sternzellen einher. So zeigte sich unter Crenolanib-Behandlung eine Steigerung der Expression von Progenitorzell- sowie Hepatozytenmarkern. Gleichzeitig wurden unter Behandlung mit Crenolanib typische Marker ruhender und aktivierter hepatischer Sternzellen vermindert exprimiert. Der Verlust ihres ursprünglichen Expressionsmusters kann als weiterer Hinweis für eine einsetzende Entwicklung der Sternzellen gewertet werden.

Als ursächlichen Faktor für einen Teil der unter Crenolanib beobachteten Effekte konnten wir eine verstärkte Phosphorylierung der MAPK p38 identifizieren. Ebenfalls wurden einige Wachstumsfaktoren, die Einfluss auf eine hepatische Differenzierung nehmen können, in hepatischen Sternzellen unter Crenolanib-Behandlung verstärkt exprimiert.

Bedeutung der PDGFR-Signalwege für hepatische Sternzellen

Die beschriebenen Ergebnisse unserer Experimente liefern neue Erkenntnisse über den Einfluss von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie den PDGFR auf das Verhalten hepatischer Sternzellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Zunächst konnte der in der Literatur beschriebene Effekt der Proliferationssteigerung durch PDGF-BB und PDGF-DD für hepatische Sternzellen *in vitro* nachvollzogen werden^{181–183}. Dabei zeigten die Liganden des PDGFR β , PDGF-BB und PDGF-DD, eine Steigerung der Proliferationsrate hepatischer Sternzellen. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor für Rezeptor-Tyrosin-Kinasen Crenolanib diesen, durch Liganden vermittelten

Effekt der Proliferation, suffizient inhibieren konnte und zu einem Proliferationsarrest hepatischer Sternzellen in Kultur führte.

Überraschenderweise induzierte eine Inhibition der PDGFR-vermittelten Signalwege konstant über alle Versuchsreihen eine hepatische Differenzierung der Sternzellen *in vitro*. Dabei exprimierten die hepatischen Sternzellen sowohl Progenitorzellmarker wie EpCAM, CK19 und AFP als auch Marker von Hepatozyten wie CK18, FOXA3, BSEP und HNF4 α . Für einige wenige untersuchten Marker wie MRP2 und NTCP zeigte sich hingegen keine Expressionssteigerung unter Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle (Ergebnisse nicht dargestellt). Ein Anstieg dieser Marker wurde in früheren Differenzierungsprotokollen mit HGF/FGF4 oder TUDC in hepatischen Sternzellen beobachtet^{42,141}, weshalb davon auszugehen ist, dass Crenolanib zwar die Differenzierung von hepatischen Sternzellen zu Hepatozyten begünstigt, für eine vollständige Entwicklung jedoch der Einfluss weiterer Faktoren benötigt wird. Weiterhin zeigte sich, dass nur ein Teil der behandelten hepatischen Sternzellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen mit Proteinnachweis von CK18 innerhalb von 7 Tagen differenzierte. Anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen konnte beobachtet werden, dass sich in Kultur Differenzierungscluster von hepatischen Sternzellen bildeten. In diesen Differenzierungsclustern zeigten sich CK18-positive Sternzellen mit einer Ko-Expression des HSC-Markers Desmin als Hinweis auf ihren Ursprung aus hepatischen Sternzellen. Die CK18- sowie Desmin-positiven HSCs waren dabei sowohl von Desmin-positiven Sternzellen ohne deutliche Hinweise auf eine Differenzierung als auch von Sternzellen ohne Expression von Differenzierungsmarkern und reduzierter Desmin-Expression umgeben. Aufgrund dieser Beobachtungen kann vermutet werden, dass möglicherweise Zell-Zell-Interaktionen Einfluss auf die Crenolanib-vermittelten Differenzierungsvorgänge nehmen und dass benachbarte, nicht differenzierende hepatische Sternzellen die Differenzierungsvorgänge beeinflussen und eventuell unterstützen. Der gemessene generelle Rückgang der Desmin-Expression sowie der Rückgang von Markern aktivierter Sternzellen wie α SMA und COL1 α 2 zeigen insgesamt, dass sich Sternzellen unter Crenolanib von dem klassischen Phänotyp und Expressionsmuster aktivierter Sternzellen wegentwickeln. Wir vermuten, dass die Sternzellen ohne Expression von Hepatozyten-Markern und mit reduzierter Desmin-Expression unreif sind oder eventuell in eine uns bisher unbekannt Richtung differenzieren. Zur Klärung der letzten Frage wurde untersucht, ob Sternzellen unter Crenolanib-Behandlung eine Differenzierung in andere mesenchymale Zelllinien wie Adipozyten und Osteozyten durchliefen oder pankreatische Marker exprimierten. Hierbei konnte allerdings keine eindeutige Differenzierung hin zu einem adipozytären (FABP4), osteozytären (Osteocalcin) oder pankreatischen (Insulin, Amylase 2) Zellphänotyp

beobachtet werden. Interessanterweise zeigte sich bereits unter serumfreien Kulturbedingungen eine deutliche Expression von FABP4 in hepatischen Sternzellen, die unter Crenolanib-Behandlung stark vermindert wurde. Ob der Anstieg der FABP4-Expression unter serumfreien Kontrollbedingungen eine Entwicklung hin zu Adipozyten widerspiegelt, kann derzeit nicht beantwortet werden und erfordert weitere Untersuchungen. Eine erhöhte Fetteinlagerung in Sternzellen wurde unter serumfreien Kulturbedingungen nicht festgestellt. Um die genaue Entwicklungsrichtung der Desmin-negativen und Hepatozytenmarker-negativen Sternzellen zu klären, sind weitere Untersuchungen notwendig. Möglicherweise könnte es sich bei diesen Zellen um noch unreife Entwicklungsstadien Hepatozyten-ähnlicher Zellen handeln, die aufgrund der kurzen Behandlungsdauer noch keine Protein-Expression typischer Marker zeigen. Auch bleibt die Frage offen, warum sich nur eine bestimmte Subpopulation der Sternzellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen weiterentwickelte, welche Eigenschaften diese Subpopulation definierten und welche Faktoren daran beteiligt waren, diese Entwicklungsrichtung zu initiieren. Hepatische Sternzellen wurden bereits in früheren Arbeiten als heterogene Zellpopulation mit Expression unterschiedlicher Mengen Vitamin A und unterschiedlich ausgeprägter Expression intrazellulärer Filamente abhängig von ihrer Lokalisation im Leberlobus, der untersuchten Spezies sowie in Abhängigkeit von Schädigungsprozessen der Leber beschrieben³⁵. So konnten Ballardini et al. zeigen, dass die Expression von Desmin in hepatischen Sternzellen der Ratte abhängig von ihrer Lokalisation in der Leber variiert¹⁹². Hepatische Sternzellen im Bereich der Periportalfelder zeigten dabei eine konstante Expression von Desmin, während hepatische Sternzellen im Bereich der Zentralvene zum Teil keine Expression von Desmin zeigten¹⁹². Ramm et al. konnten durch Isolierung einer Desmin-negativen, Vitamin A-armen hepatischen Sternzell-Subpopulation und einer Desmin-positiven, Vitamin A-reichen Subpopulation aus Ratten zeigen, dass unterschiedliche Subpopulationen von Sternzellen existieren¹⁹³. Möglicherweise definieren auch bei unseren Beobachtungen distinkte Expressionsmuster die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Subpopulation. Die kurze Laufzeit der Experimente von 7 Tagen ist im Zusammenhang mit dem beobachteten heterogenen Verhalten der Sternzellen besonders zu beachten, da anzunehmen ist, dass dieser Zeitraum nicht für alle hepatischen Sternzellen ausreicht, um eine definierte Entwicklung zu durchlaufen. In der Literatur beschriebene Differenzierungsexperimente mit hepatischen Sternzellen und MSCs wurden meist über 21 bis 28 Tage durchgeführt^{41,42,129,194}. Bemerkenswert ist jedoch, dass bereits in der ersten Woche unter Crenolanib in einzelnen Sternzellen deutliche Hinweise auf eine Differenzierung festzustellen waren und dieser Zeitraum somit für die Untersuchung initialer Effekte geeignet erschien.

Interessanterweise konnten wir zunächst keine Expressionssteigerung des Hepatozytenmarkers Albumin unter Crenolanib-Behandlung beobachten (Ergebnisse nicht dargestellt). Weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass die mRNA-Expression von Albumin unter Crenolanib-Behandlung gesteigert wird, wenn dem serumfreien Medium Insulin zugesetzt wird (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Mechanismus der Albuminsynthese in hepatischen Sternzellen scheint somit von Insulin abhängig. Diese Beobachtung deckt sich mit den Untersuchungen von Chen et al., die an Knockout-Mäusen zeigen konnten, dass die Albuminsynthese der Leber von Insulin gefördert wird ¹⁹⁵. Dabei vermittelt Insulin über den Insulinrezeptor und nachfolgende Aktivierung des Akt-Signalweges eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors FOXO1 (*forkhead box protein O1*), der die Albuminsynthese hemmt ¹⁹⁵.

Unter steigenden Konzentrationen von Crenolanib (1000 nM im Vergleich zu 100 nM und 10 nM) zeigte sich in hepatischen Sternzellen eine ebenfalls ansteigende mRNA-Expression von Hepatozyten- und Progenitorzellmarkern im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings konnte bei Behandlung mit höheren Konzentrationen von Crenolanib auch eine vermehrte Ablösung der hepatischen Sternzellen von der Kulturschale im Verlauf der Kultivierung beobachtet werden. Es besteht also ein kritisches Gleichgewicht zwischen dem Proliferationsstopp und Differenzierungsvorgängen einerseits und dem Zellüberleben andererseits. Aus diesem Grund zeigte sich die Konzentration von 100 nM Crenolanib am zuverlässigsten und besten geeignet für weitere Experimente ohne Einschränkungen der Zellvitalität.

Unter Crenolanib konnte ein Absinken typischer Marker aktivierter Sternzellen wie α SMA, Desmin und Kollagen 1 α 2 festgestellt werden. Im Rahmen der Forschung zur Fibroseentstehung der Leber konnte bereits gezeigt werden, dass Inhibition der PDGFR-Signalwege durch den Tyrosin-Kinaseinhibitor Imatinib bei chronischer Leberschädigung zu einer verminderten Fibroseentstehung *in vivo* führt, sowie *in vitro* die Expression profibrotischer Marker wie α SMA, Kollagen 1 α 1, TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases 1*) und TGF β in hepatischen Sternzellen reduziert ¹⁹⁶. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass hepatische Sternzellen unter Crenolanib-Behandlung während ihrer Aktivierung unter Kulturbedingungen nicht den aus der Fibroseentstehung bekannten Phänotyp einer Myofibroblasten-ähnlichen Zelle mit Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile annehmen, sondern vielmehr diese Entwicklung inhibiert wird. Die Einleitung einer Differenzierung hin zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen wurde unter diesen Bedingungen jedoch bisher nicht beschrieben.

Für Zellen der Linie WB-F344, die als Progenitorzellen von Hepatozyten in Nagern beschrieben wurden^{68,69}, konnte ein Expressionsmuster analog zu LPCs nachgewiesen werden. Zudem exprimierten die Zellen den PDGFR β . Unter Inhibition der PDGFR-Signalwege durch Crenolanib zeigte sich die mRNA-Expression der Progenitorzellmarker unbeeinflusst. Allerdings zeigte sich für einzelne Hepatozytenmarker wie HNF4 α eine signifikante Steigerung der mRNA-Expression unter Crenolanib im Vergleich zur Kontrolle. Für andere Marker von Hepatozyten wurde eine Tendenz zu einer erhöhten mRNA-Expression unter Crenolanib festgestellt. In Ansätzen konnten wir somit analog zu hepatischen Sternzellen in Zellen der Linie WB-F344 eine Induktion einer hepatischen Differenzierung beobachten. Eine mögliche Erklärung für die nur partielle Induktion einer hepatischen Differenzierung ist hierbei die eingesetzte Konzentration von 100 nM Crenolanib, die die beobachtete intrinsische Proliferation der WB-F344-Zellen möglicherweise nur unzureichend inhibieren konnte.

Der Mechanismus, über den die Wirkung von Crenolanib auf hepatische Sternzellen vermittelt wird, konnte zum Teil geklärt werden. So wurde die Phosphorylierung der MAPK p38 als ein an der durch Crenolanib induzierten Differenzierung beteiligter Signalweg identifiziert. Auch in der Literatur ist der Einfluss der MAPK p38 auf verschiedene Differenzierungsvorgänge von embryonalen Stammzellen und MSCs beschrieben. So wurde eine Beteiligung des MAPK-Signalwegs an der embryonalen Entwicklung und Differenzierung embryonaler Stammzellen durch Phosphorylierung der MAPK p38 bereits aufgezeigt¹⁹⁷. Ebenfalls wurde beschrieben, dass die über HGF-vermittelte Differenzierung von humanen MSCs zu Osteozyten durch die MAPK p38 reguliert wird¹⁹⁸. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Differenzierung von MSCs aus dem Knochenmark der Ratte zu Chondrozyten durch Phosphorylierung der MAPK p38 vermittelt wird¹⁹⁹. Für murine MSC des Knochenmarks wurde beschrieben, dass die Differenzierung zu Hepatozyten mittels FGF4- und HGF-Behandlung durch die MAPK p38 gefördert wird²⁰⁰. Die Autoren konnten hierbei durch Inhibition der Phosphorylierung von MAPK p38 mittels SB203580 die Aktivierung früher Gene der Differenzierung zu Hepatozyten verhindern. In unseren Experimenten inhibierte SB203580 ebenfalls die Expressionssteigerung der frühen Progenitorzellmarker CK19 und EpCAM unter Crenolanib. Andere Hepatozytenmarker wie CK18 zeigten sich hingegen unbeeinflusst durch Inhibition der Phosphorylierung der MAPK p38. Somit kann nur ein Teil des durch Crenolanib vermittelten Effekts durch Phosphorylierung der MAPK p38 erklärt werden. An der beobachteten Differenzierung müssen neben der MAPK p38 weitere Signalwege beteiligt sein. Um diese Signalwege zu identifizieren und ihren Einfluss sowie ihre Regulation zu verstehen, sind weiterführende Untersuchungen nötig.

Bereits aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass hepatische Sternzellen eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die für die eigene Unterhaltung und Funktion benötigt werden, selbst produzieren. Unter Crenolanib-Behandlung konnten wir im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine veränderte mRNA-Expression verschiedener Wachstumsfaktoren beobachten. So konnte eine Expressionssteigerung der Wachstumsfaktoren HGF, FGF7, FGF10 und FGF15 beobachtet werden, während hingegen PDGF-BB, FGF1 und FGF2 vermindert exprimiert wurden. HGF wirkt mitogen auf Hepatozyten, ist entscheidend an der embryonalen Entwicklung der Leber beteiligt und kann in Kombination mit weiteren Wachstumsfaktoren eine Differenzierung von MSCs und Sternzellen zu Hepatozyten-ähnlichen Zellen bewirken^{41,53,201,202}. Für die Familie der *fibroblast growth factors* wurde ein Einfluss auf Zellproliferation, Migration und Differenzierung epithelialer Zellen beschrieben²⁰³. So wurde festgestellt, dass eine Überexpression von FGF7 in β -Zellen der Langerhans' Inseln zu einem Auftreten Hepatozyten-ähnlicher Zellen im Pankreas transgener Mäuse führte²⁰⁴. FGF10 ist an der Organogenese der Leber während der Embryonalentwicklung beteiligt, insbesondere wurde gezeigt, dass FGF10 das Leberwachstum aber auch die Proliferation von Hepatoblasten fördert^{205,206}. Zudem konnte ein wichtiger Einfluss von FGF10 auf die Differenzierung humaner embryonaler Stammzellen zu Hepatozyten *in vitro* nachgewiesen werden²⁰⁷. FGF15 wurde dagegen bisher vor allem mit der Regulation der Gallensalzsäuresynthese in der Leber und nicht mit Differenzierungsprozessen in Verbindung gebracht²⁰⁸. Es konnte gezeigt werden, dass FGF15/FGF19 durch anfallende Gallensalze vermehrt im Ileum exprimiert wird und die Gallensalzsäuresynthese durch Inhibition des Schlüsselenzyms der Gallensalzsäuresynthese, Cholesterol-7 α -Hydroxylase, in der Leber reduziert und somit einen wichtigen Faktor in der Gallensalzhomöostase darstellt²⁰⁸. Durch alleinige Stimulation hepatischer Sternzellen mit HGF, FGF7 und FGF15 konnte die Induktion von Progenitorzell- und Hepatozytenmarkern unter Crenolanib allerdings nicht reproduziert werden. Nur unter FGF7 zeigte sich ein Anstieg der mRNA-Expression der Progenitorzellmarker im Vergleich zur Kontrolle. Eine Steigerung der mRNA-Expression von Markern reifer Hepatozyten konnte hingegen nicht nachgewiesen werden. Allerdings konnte unter Stimulation der hepatischen Sternzellen mit den verschiedenen Wachstumsfaktoren ebenfalls eine Steigerung der Proliferation beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass während der Stimulationsexperimente die proliferationssteigernden Eigenschaften der eingesetzten Wachstumsfaktoren überwogen, wodurch möglicherweise differenzierungsfördernde Effekte inhibiert wurden. Die Behandlung mit Crenolanib könnte durch Hemmung der Proliferation einen Kontext schaffen, bei dem die differenzierungsfördernden Eigenschaften der Wachstumsfaktoren gegenüber der Proliferationssteigerung überwiegen. Um diese Hypothese zu überprüfen, sind allerdings

weitere Experimente notwendig, bei denen unabhängig von Crenolanib ein Proliferationsarrest initiiert wird und der Effekt der Wachstumsfaktoren unter diesen Bedingungen untersucht werden kann. Weitere Gründe für das Ausbleiben einer deutlichen hepatischen Differenzierung unter Stimulation mit den genannten Wachstumsfaktoren könnten zudem die kurze Behandlung der Zellen von nur 7 Tagen sowie eine zu geringe Konzentration der Wachstumsfaktoren sein. Möglich ist auch, dass es durch die kontinuierliche Zugabe einer einzelnen Substanz nicht gelingt, die Bedingungen zu schaffen, die durch ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Substanzen und Variation ihrer Konzentrationen im Zeitverlauf entstehen. Bisher wurden Expressionsunterschiede der Wachstumsfaktoren auf mRNA-Ebene gemessen. Die genaue Zusammensetzung der sezernierten Wachstumsfaktoren im Überstand sowie ihre Konzentration unter Crenolanib im Zeitverlauf wurden bisher nicht analysiert und müssen in weiterführenden Experimenten zum Beispiel durch Immunpräzipitation, Protein-Arrays oder ELISA-Messungen des Überstands bestimmt werden.

Die gemessene verringerte mRNA-Expression der Wachstumsfaktoren PDGF-BB, FGF1 und FGF2 ist möglicherweise ursächlich für den unter Crenolanib beobachteten Proliferationsarrest. PDGF-BB ist ein wichtiges und potentes Mitogen von MSCs und hepatischen Sternzellen^{181,182}, aber auch FGF1 und FGF2 wirken als Mitogene während der Leberregeneration^{93,209}. Wir konnten eine Steigerung der Proliferation hepatischer Sternzellen unter FGF1-Behandlung nachweisen. Zudem wurde beschrieben, dass eine Stimulation mit FGF1 und FGF2 die Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen zu Neuronen inhibiert²¹⁰. Es ist denkbar, dass FGF1 und FGF2 auch die hepatische Differenzierung inhibieren und Inhibition der beiden Wachstumsfaktoren durch Crenolanib umgekehrt eine Differenzierung begünstigt.

Aufgrund unserer Daten zum *in vitro*-Verhalten der Sternzellen bei Inhibition von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie den PDGFR, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass bei hepatischen Sternzellen ein kritisches Gleichgewicht zwischen Proliferation und Differenzierung besteht (**Abb. 34**). Es ist davon auszugehen, dass im ruhenden Zustand der Sternzellen weder Proliferations- noch Differenzierungsvorgänge ablaufen, da die entsprechenden Signalwege durch epigenetische Mechanismen unterdrückt sind²¹¹. Werden hepatische Sternzellen hingegen aktiviert, wie etwa durch eine Schädigung der Leber *in vivo* oder durch Kultivierung auf Plastik-Gewebekulturplatten *in vitro*, können entweder Signale überwiegen, die eine Zellproliferation fördern oder diese inhibieren und damit eine Differenzierung begünstigen. In unseren Experimenten konnten wir insbesondere PDGF-BB und PDGF-DD als Stimuli der Proliferation hepatischer Sternzellen identifizieren, die diesen Effekt über Phosphorylierung vor allem der Signalmoleküle MAPK

ERK1/2 sowie der Proteinkinase Akt vermitteln. Im Gegensatz dazu steht Crenolanib, das über Inhibition proliferationsfördernder Signalwege wie der PDGFR, einhergehend mit einer verminderten Phosphorylierung der MAPK ERK1/2, eine Proliferation der Sternzellen verhindert und eine Differenzierung hepatischer Sternzellen begünstigt. Dabei wurde die Phosphorylierung der MAPK p38 als ein beteiligter Mechanismus an der durch Crenolanib induzierten Differenzierung hepatischer Sternzellen identifiziert (**Abb. 34**). Unklar bleibt jedoch, ob die Aktivierung der MAPK p38 allein für die Vermittlung der Differenzierung verantwortlich ist. Aufgrund der vorliegenden Befunde im Rahmen der Inhibition der MAPK p38 ist dies vermutlich nicht der Fall, da die Crenolanib-vermittelte Induktion der Genexpression einzelner hepatischer Marker wie CK18 durch den p38 MAPK-Inhibitor SB203580 nicht verhindert werden konnte. Ein weiterer möglicher Signalweg, der zusätzlich zur p38 MAPK-Aktivierung eine Differenzierung von Sternzellen vermitteln könnte, ist die c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Bereits frühere Experimente konnten eine Beteiligung des JNK-Signalwegs an Differenzierungsprozessen nachweisen. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der JNK an der Differenzierung von humanen MSCs des Knochenmarks zu Osteoblasten beteiligt ist und eine Inhibierung der Phosphorylierung der JNK durch SP600125 diese Differenzierung inhibiert ²¹². Auch für die Differenzierung von murinen MSCs des Knochenmarks zu Pneumozyten Typ II konnte eine Beteiligung des JNK-Signalwegs nachgewiesen werden ²¹³. Park et al. konnten zeigen, dass Behandlung mit Interleukin 1 β durch Aktivierung des Wnt-Signalwegs und *downstream* Phosphorylierung der JNK eine Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen induziert ²¹⁴. Diese Differenzierungsvorgänge konnten unter anderem durch die Zugabe des spezifischen Inhibitors der Phosphorylierung der JNK SP600125 inhibiert werden ²¹⁴. Ob Crenolanib ebenfalls die Phosphorylierung der JNK in hepatischen Sternzellen induziert, ist bisher nicht bekannt und Gegenstand weiterer Untersuchungen.

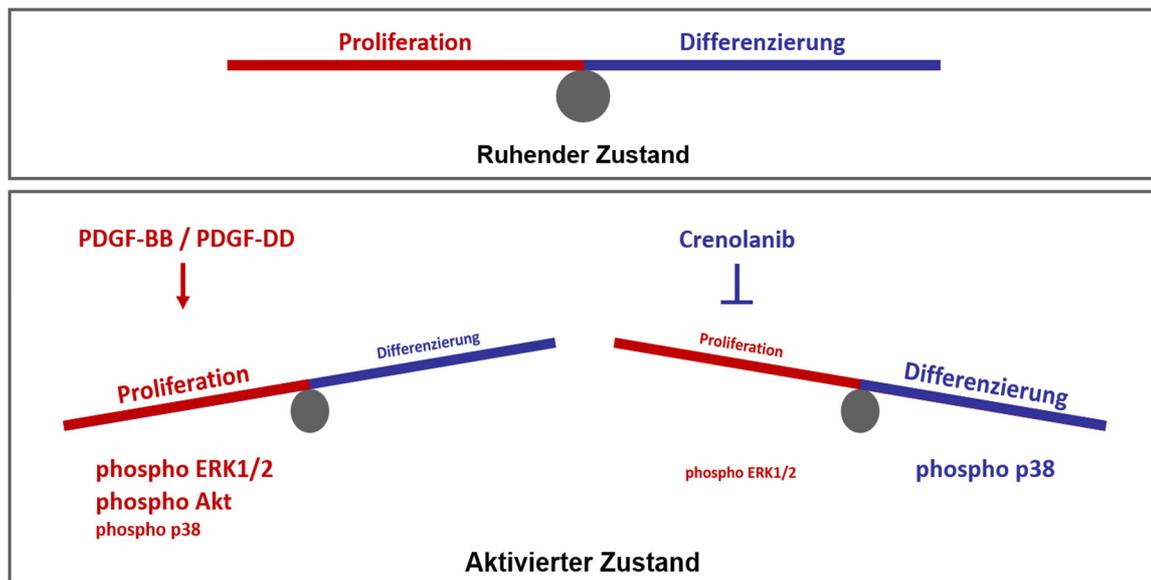


Abbildung 34: Proliferation und Differenzierung als konkurrierende Prozesse in hepatischen Sternzellen. Wir formulieren die Hypothese, dass Proliferationsvorgänge und Differenzierungsvorgänge bei hepatischen Sternzellen in einem kritischen Gleichgewicht zueinander stehen. In ruhenden hepatischen Sternzellen sind durch epigenetische Mechanismen Signalwege für Proliferations- sowie für Differenzierungsvorgänge unterdrückt ²¹¹. Kommt es hingegen zu einer Aktivierung hepatischer Sternzellen, können entweder Stimuli für Proliferationsvorgänge oder Stimuli für Differenzierungsvorgänge überwiegen. Als Stimuli der Zellproliferation wurden unter anderem PDGF-BB und PDGF-DD identifiziert, welche vor allem eine Phosphorylierung der MAPK ERK1/2 sowie der Proteinkinase Akt und nur zu einem geringen Teil der MAPK p38 vermitteln. Dem gegenüber werden Differenzierungsvorgänge unter anderem durch die Phosphorylierung der MAPK p38 bei gleichzeitig verringerter Phosphorylierung proliferationsfördernder Signalmoleküle wie der MAPK ERK1/2 vermittelt.

Das Prinzip der gegenseitigen Beeinflussung von Proliferation und Differenzierung in Bezug auf Stammzellen wurde bereits für verschiedene Organsysteme diskutiert. So geht man davon aus, dass während der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine Verlängerung des Zellzyklus, insbesondere der G1-Phase, nach einer vorangegangenen Proliferationsphase eine Differenzierung neuronaler Zellen bewirkt ²¹⁵. Es konnte gezeigt werden, dass Inhibition der den Zellzyklus regulierenden CDKs (*cyclin-dependent kinases*) und die darauffolgende verlängerte G1-Phase direkt zu einer Induktion der neuronalen Differenzierung führt ²¹⁶. Eine Verlängerung der G1-Phase konnte neben neuronalen Stammzellen auch für embryonale und hämatopoetische Zellen als Induktor einer Differenzierung nachgewiesen werden ²¹⁷. Es wird vermutet, dass durch eine verlängerte G1-Phase, eine längere Wirkungsdauer und Akkumulation differenzierungsfördernder Faktoren und Stimuli ermöglicht wird ²¹⁷.

Ruijtenberg und van den Heuvel beschrieben in einem Review die inverse Beziehung von Proliferation und Differenzierung für verschiedene Zellsysteme ²¹⁸. Dabei beschrieben die Autoren sowohl die Inhibition von Differenzierungsvorgängen durch proliferationsfördernde

Stimuli, als auch die Induktion von Differenzierung durch einen Proliferationsstopp und permanenten Zellzyklusarrest im Zusammenhang mit der Entwicklung von Muskelzellen, Neuronen, Gameten und Erythrozyten ²¹⁸. In diesem Zusammenhang konnte festgestellt werden, dass sich proliferationsfördernde Zellzyklus-Regulatoren wie CDK und Cycline und differenzierungsfördernde Transkriptionsfaktoren wechselseitig hemmen können ²¹⁸. Als weiteren Mechanismus der wechselseitigen Beeinflussung von Proliferation und Differenzierung beschrieben die Autoren die gezielte Inhibition oder Förderung von hemmenden zellzyklusregulierenden Faktoren wie CDK-Inhibitoren und Retinoblastom (Rb)-Protein sowie von Regulatoren der Chromatinstruktur, die entweder proproliferative oder differenzierende Signale begünstigen können ²¹⁸. Die inverse Beziehung und gegenseitige Beeinflussung von Proliferation und Differenzierung bei Stammzellen zeigt sich damit als übergeordnetes Prinzip des Organismus, das durch orchestrierte gegenseitige Abstimmung an der Entstehung und Erhaltung verschiedener Organsysteme beteiligt ist.

Bedeutung der PDGFR-Signalwege für die Leberregeneration

Unsere Untersuchungen der *in vivo* Leberregenerationsmodelle unterstützen die Hypothese, dass Sternzellen Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen besitzen und in dieser Funktion an der stammzellbasierten Leberregeneration beteiligt sind.

Anhand der räumlichen Lage innerhalb der Sinusoide, der sternförmigen Zellmorphologie sowie der Ko-Expression mit dem Sternzellmarker Desmin konnten der PDGFR α und der PDGFR β in hepatischen Sternzellen der Rattenleber nachgewiesen werden. Auch *in vitro* konnten die mesenchymalen Marker PDGFR α und β sowohl in ruhenden als auch in aktivierten hepatischen Sternzellen nachgewiesen werden.

Die starke Expressionssteigerung von PDGFR β sowie seiner Liganden im Rahmen der PHX/2AAF-Leberregeneration deuten darauf hin, dass der PDGFR β -Signalweg maßgeblich an den Regenerationsprozessen der stammzellbasierten Leberregeneration beteiligt ist, wohingegen dies während der Leberregeneration nach PHX nicht beobachtet werden konnte.

Dabei zeigte sich in der Immunfluoreszenz die verstärkte PDGFR β -Expression insbesondere im Bereich der CK19-positiven duktilären Reaktion, ausgehend von den Portalfeldern bei gleichzeitiger Ko-Expression der PDGFR β -positiven Zellen mit α SMA und Desmin, Markern hepatischer Sternzellen. Aus diesem Grund gehen wir davon aus, dass der PDGFR β vermehrt von hepatischen Sternzellen während der stammzellbasierten Leberregeneration gebildet wird. In Hepatozyten konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in

der normalen Leber sowie im Rahmen der untersuchten Leberregenerationsmodelle (PHX und PHX/2AAF) keine Expression des PDGFR β beobachtet werden. Allerdings wurde im Rahmen von chronischen Leberschädigungsmodellen und nach mehrtägiger Kultivierung von Hepatozyten der Ratte *in vitro* eine Expression beider PDGFR in Hepatozyten beschrieben. Die PDGFR-Expression kann als Zeichen einer Dedifferenzierung von Hepatozyten im Rahmen einer epithelialen-mesenchymalen Transition gewertet werden ²¹⁹.

In der hochauflösenden Lichtmikroskopie konnten wir zeigen, dass PDGFR β -positive Zellen die Zellen der duktilären Reaktion direkt umranden und eine klare Grenzzone zum übrigen Leberparenchym bilden. Die genaue Funktion dieser Zellen können unsere Ergebnisse jedoch nicht abschließend klären.

Wir vermuten in Zusammenschau aller Ergebnisse und aufgrund der Rolle hepatischer Sternzellen als MSCs der Leber, dass hepatische Sternzellen im Zuge der stammzellbasierten Leberregeneration aktiviert werden, proliferieren und dabei die von den Portalfeldern ausgehende duktiläre Reaktion unterstützen. Dabei wäre ein Einfluss von PDGFR β insbesondere in Bezug auf die proliferationsfördernde Wirkung denkbar. Auf welchen Mechanismen die unterstützende Funktion der Sternzellen bei der duktilären Reaktion letztlich beruht, ist im Rahmen der beschriebenen Ergebnisse nicht abschließend zu klären. Möglich wäre eine unterstützende Funktion durch die Sezernierung von Wachstumsfaktoren wie HGF ²²⁰, die Interaktion über direkte Zell-Zell-Kontakte oder das Ausbilden einer Matrix, entlang derer LPCs migrieren und proliferieren können. Denkbar wäre zudem neben der unterstützenden Funktion bereits vorhandener LPCs auch eine Differenzierung der aktivierten, PDGFR β -positiven hepatischen Sternzellen zu hepatischen Progenitorzellen. Die Arbeitsgruppe um Professor Dr. Häussinger beschrieb hepatische Sternzellen bereits in früheren Arbeiten als mögliche Quelle von LPCs während der stammzellbasierten Leberregeneration ⁴¹. In diesem Zusammenhang wäre auch ein zweiphasisches Modell denkbar, mit zunächst starker Proliferation und Migration hepatischer Sternzellen unter PDGFR β -Einfluss und anschließender Differenzierung zu LPCs und Hepatozyten. Diese Frage ist allerdings nicht allein durch die Ergebnisse dieser Arbeit zu erklären und erfordert weitere Analysen wie beispielsweise *lineage-tracing* Analysen, welche die genaue Herkunft der LPCs und im weiteren Verlauf der Hepatozyten aufklären. Ebenso ist die genaue Funktion des PDGFR β in der stammzellbasierten Leberregeneration bisher unklar. Durch Behandlung mit 5-Azacytidin und PDGF-AB konnten PDGFR α -abhängig reife Knochen- und Fettzellen in multipotente MSCs umgewandelt werden ²²¹. Diese von den Autoren als iMSCs (induzierte mesenchymale Stammzellen) bezeichneten Zellen zeigten langfristiges Koloniebildungs- und Selbsterneuerungspotential, immunsuppressive Eigenschaften sowie ein multipotentes

Differenzierungspotential und sind direkt mit der Geweberegeneration *in vivo* assoziiert ²²¹. Dabei vermuten die Autoren, dass das demethylierende 5-Azacytidin zu einer Re-Expression von Stammzellgenen führt und dass PDGF-AB als mitogener und antiapoptotischer Stimulus den Charakter der iMSCs erhält ²²¹. Möglicherweise haben die Rezeptoren PDGFR α und β differentielle Effekte in hepatischen Sternzellen, wie durch den selektiven Anstieg des PDGFR β während der stammzellbasierten Leberregeneration vermutet werden kann. Die unterstützende Wirkung der PDGFR auf die Proliferation konnte in der vorliegenden Arbeit an isolierten hepatischen Sternzellen nachvollzogen werden. Ob dieser Mechanismus auch *in vivo* die Leberregeneration essentiell unterstützt und seine Terminierung für eine effektive Differenzierung erforderlich ist, kann durch eine Inhibition der PDGFR-vermittelten Signalwege mittels *small molecules* wie Crenolanib unter Einsatz des PHX/2AAF-Modells in zukünftigen Untersuchungen geklärt werden.

Literaturverzeichnis

1. Wake K. "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A. *Am J Anat.* 1971;132:429-462.
2. Wake K. Cell-cell organization and functions of 'sinusoids' in liver microcirculation system. *J Electron Microsc.* 1999;48:89-98.
3. Wake K. Perisinusoidal Stellate Cells (Fat-Storing Cells, Interstitial Cells, Lipocytes), Their Related Structure in and around the Liver Sinusoids, and Vitamin A-Storing Cells in Extrahepatic Organs. *Int Rev Cytol.* 1980;66:303-353.
4. Giampieri MP, Am Jezequel, Orlandi F. The lipocytes in normal human liver. A quantitative study. *Digestion.* 1981;22:165-169.
5. Jezequel AM, Novelli G, Venturini C, Orlandi F. Quantitative Analysis of the Perisinusoidal Cells in Human Liver: The Lipocytes. *Front Gastrointest Res.* 1984;8:85-90.
6. Blomhoff R, Holte K, Naess L, Berg T. Newly administered [3H]retinol is transferred from hepatocytes to stellate cells in liver for storage. *Exp Cell Res.* 1984;150:186-193.
7. Blaner WS, Hendriks H, Brouwer A, Leeuw AM de, Knook DL, Goodman DS. Retinoids, retinoid-binding proteins, and retinyl palmitate hydrolase distributions in different types of rat liver cells. *J Lipid Res.* 1985;26:1241-1251.
8. Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Am Leeuw, Knook DL. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp Cell Res.* 1985;160:138-149.
9. Hendriks HF, Blaner WS, Wennekers HM, et al. Distributions of retinoids, retinoid-binding proteins and related parameters in different types of liver cells isolated from young and old rats. *Eur J Biochem.* 1988;171:237-244.
10. Ito T. Recent advances in the study on the fine structure of the hepatic sinusoidal wall. *Gumna Rep Med Sci.* 1973;20:119-163.
11. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science.* 1990;250:399-404.
12. Popper H. Distribution of vitamin A in tissue as visualized by fluorescence microscopy. *Physiol Rev.* 1944;24:205-224.
13. Wake K, Motomatsu K, Senoo H. Stellate cells storing retinol in the liver of adult lamprey, *Lampetra japonica*. *Cell Tissue Res.* 1987;249:289-299.
14. Geerts A. On the origin of stellate cells: Mesodermal, endodermal or neuro-ectodermal? *J Hepatol.* 2004;40:331-334.

15. Asahina K, Tsai SY, Li P, et al. Mesenchymal origin of hepatic stellate cells, submesothelial cells, and perivascular mesenchymal cells during mouse liver development. *Hepatology*. 2009;49:998-1011.
16. Enzan H, Himeno H, Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microsc Res Tech*. 1997;39:336-349.
17. Yokoi Y, Namihisa T, Kuroda H, et al. Immunocytochemical Detection of Desmin in Fat-Storing Cells (Ito Cells). *Hepatology*. 1984;4:709-714.
18. Zhao L, Burt AD. The diffuse stellate cell system. *J Mol Histol*. 2007;38:53-64.
19. Ramadori G, Veit T, Schwogler S, et al. Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1990;59:349-357.
20. Gard AL, White FP, Dutton GR. Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *J Neuroimmunol*. 1985;8:359-375.
21. Niki T, Pekny M, Hellemans K, et al. Class VI intermediate filament protein nestin is induced during activation of rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999;29:520-527.
22. Buchholz M, Kestler HA, Holzmann K, et al. Transcriptome analysis of human hepatic and pancreatic stellate cells: organ-specific variations of a common transcriptional phenotype. *J Mol Med*. 2005;83:795-805.
23. Omary MB, Lugea A, Lowe AW, Pandol SJ. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. *J Clin Invest*. 2007;117:50-59.
24. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol*. 2007;170:1807-1816.
25. Nagy NE, Holven KB, Roos N, et al. Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res*. 1997;38:645-658.
26. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: the principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82:8681-8685.
27. McGee JO, Patrick RS. The role of perisinusoidal cells in hepatic fibrogenesis. An electron microscopic study of acute carbon tetrachloride liver injury. *Lab Invest*. 1972;26:429-440.
28. Minato Y, Hasumura Y, Takeuchi J. The role of fat-storing cells in Disse space fibrogenesis in alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1983;3:559-566.

29. Geerts A, Vrijzen R, Rauterberg J, Burt A, Schellinck P, Wisse E. In vitro differentiation of fat-storing cells parallels marked increase of collagen synthesis and secretion. *J Hepatol.* 1989;9:59-68.
30. Rockey DC, Boyles JK, Gabbiani G, Friedman SL. Rat hepatic lipocytes express smooth muscle actin upon activation in vivo and in culture. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1992;24:193-203.
31. Friedman SL, Wei S, Blaner WS. Retinol release by activated rat hepatic lipocytes: regulation by Kupffer cell-conditioned medium and PDGF. *Am J Physiol.* 1993;264:52.
32. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275:2247-2250.
33. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005;115:209-218.
34. Friedman SL. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol.* 2003;38:38-53.
35. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev.* 2008;88:125-172.
36. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis.* 2001;21:417-426.
37. Kordes C, Sawitza I, Götze S, Häussinger D. Hepatic stellate cells support hematopoiesis and are liver-resident mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem.* 2013;31:290-304.
38. Kiassov AP, van Eyken P, van Pelt JF, et al. Desmin expressing nonhematopoietic liver cells during rat liver development: an immunohistochemical and morphometric study. *Differentiation.* 1995;59:253-258.
39. Passino MA, Adams RA, Sikorski SL, Akassoglou K. Regulation of hepatic stellate cell differentiation by the neurotrophin receptor p75NTR. *Science.* 2007;315:1853-1856.
40. Kalinichenko VV, Bhattacharyya D, Zhou Y, et al. Foxf1 +/- mice exhibit defective stellate cell activation and abnormal liver regeneration following CCl4 injury. *Hepatology.* 2003;37:107-117.
41. Kordes C, Sawitza I, Götze S, Herebian D, Häussinger D. Hepatic stellate cells contribute to progenitor cells and liver regeneration. *J Clin Invest.* 2014;124:5503-5515.
42. Sawitza I, Kordes C, Götze S, Herebian D, Häussinger D. Bile acids induce hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Sci Rep.* 2015;5:13320.
43. Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science.* 1997;276:60-66.

44. Grisham JW. A Morphologic Study of Deoxyribonucleic Acid Synthesis and Cell Proliferation in Regenerating Rat Liver; Autoradiography with Thymidine-H3. *Cancer Res.* 1962;22:842-849.
45. Stocker E, Heine WD. Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr Pathol.* 1971;144:400-408.
46. Forbes SJ, Rosenthal N. Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nat Med.* 2014;20:857-869.
47. Higgins GM ARM. Experimental pathology of the liver, I: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch Pathology.* 1931;12:186-202.
48. Arai M, Yokosuka O, Chiba T, et al. Gene expression profiling reveals the mechanism and pathophysiology of mouse liver regeneration. *J Biol Chem.* 2003;278:29813-29818.
49. Haber BA, Mohn KL, Diamond RH, Taub R. Induction patterns of 70 genes during nine days after hepatectomy define the temporal course of liver regeneration. *J Clin Invest.* 1993;91:1319-1326.
50. Mao SA, Glorioso JM, Nyberg SL. Liver Regeneration. *Transl Res.* 2014;163:352-362.
51. Moolten FL, Bucher NL. Regeneration of rat liver: transfer of humoral agent by cross circulation. *Science.* 1967;158:272-274.
52. Forbes SJ, Newsome PN. Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;13:473-485.
53. Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature.* 1989;342:440-443.
54. Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology.* 1991;13:743-750.
55. Zarnegar R, DeFrances MC, Kost DP, Lindroos P, Michalopoulos GK. Expression of hepatocyte growth factor mRNA in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;177:559-565.
56. Schirmacher P, Geerts A, Pietrangelo A, Dienes HP, Rogler CE. Hepatocyte growth factor/hepatopoietin A is expressed in fat-storing cells from rat liver but not myofibroblast-like cells derived from fat-storing cells. *Hepatology.* 1992;15:5-11.
57. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176:2-13.

58. Ueda J, Chijiwa K, Nakano K, Zhao G, Tanaka M. Lack of intestinal bile results in delayed liver regeneration of normal rat liver after hepatectomy accompanied by impaired cyclin E-associated kinase activity. *Surgery*. 2002;131:564-573.
59. Huang W, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration. *Science*. 2006;312:233-236.
60. Zimmermann A. Regulation of liver regeneration. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19:iv4-iv10.
61. Ikeda H, Nagoshi S, Ohno A, Yanase M, Maekawa H, Fujiwara K. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250:769-775.
62. Patella S, Phillips DJ, Tchongue J, Kretser DM de, Sievert W. Follistatin attenuates early liver fibrosis: effects on hepatic stellate cell activation and hepatocyte apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;290:G137-44.
63. Stocker E, Wullstein HK, Brau G. Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine. *Virchows Arch B Cell Pathol*. 1973;14:93-103.
64. Vetelainen R, van Vliet AK, van Gulik TM. Severe steatosis increases hepatocellular injury and impairs liver regeneration in a rat model of partial hepatectomy. *Ann Surg*. 2007;245:44-50.
65. Truant S, Bouras AF, Petrovai G, et al. Volumetric gain of the liver after major hepatectomy in obese patients: a case-matched study in 84 patients. *Ann Surg*. 2013;258:696-702.
66. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. 2007;117:539-548.
67. Issa R, Zhou X, Trim N, et al. Mutation in collagen-1 that confers resistance to the action of collagenase results in failure of recovery from CCl4-induced liver fibrosis, persistence of activated hepatic stellate cells, and diminished hepatocyte regeneration. *FASEB J*. 2003;17:47-49.
68. Fausto N. Hepatocyte differentiation and liver progenitor cells. *Curr Opin Cell Biol*. 1990;2:1036-1042.
69. Thorgeirsson SS. Hepatic stem cells. *Am J Pathol*. 1993;142:1331-1333.
70. Sigal SH, Brill S, Fiorino AS, Reid LM. The liver as a stem cell and lineage system. *Am J Physiol*. 1992;263:G139-148.
71. Michalopoulos GK, Khan Z. Liver Stem Cells: Experimental Findings and Implications for Human Liver Disease. *Gastroenterology*. 2015;149:876-882.

72. Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2014;14:561-574.
73. Fausto N. Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells. *Hepatology*. 2004;39:1477-1487.
74. Solt D, Farber E. New principle for the analysis of chemical carcinogenesis. *Nature*. 1976;263:701-703.
75. Roskams TA, Libbrecht L, Desmet VJ. Progenitor cells in diseased human liver. *Semin Liver Dis*. 2003;23:385-396.
76. Roskams TA, Theise ND, Balabaud C, et al. Nomenclature of the finer branches of the biliary tree: canals, ductules, and ductular reactions in human livers. *Hepatology*. 2004;39:1739-1745.
77. Okabe M, Tsukahara Y, Tanaka M, et al. Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development*. 2009;136:1951-1960.
78. Suzuki A, Sekiya S, Onishi M, et al. Flow cytometric isolation and clonal identification of self-renewing bipotent hepatic progenitor cells in adult mouse liver. *Hepatology*. 2008;48:1964-1978.
79. Rountree CB, Barsky L, Ge S, Zhu J, Senadheera S, Crooks GM. A CD133-expressing murine liver oval cell population with bilineage potential. *Stem Cells*. 2007;25:2419-2429.
80. Yovchev MI, Grozdanov PN, Joseph B, Gupta S, Dabeva MD. Novel hepatic progenitor cell surface markers in the adult rat liver. *Hepatology*. 2007;45:139-149.
81. Yin Y, Lim YK, Salto-Tellez M, Ng SC, Lin C-S, Lim S-K. AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells*. 2002;20:338-346.
82. Huch M, Dorrell C, Boj SF, et al. In vitro expansion of single Lgr5+ liver stem cells induced by Wnt-driven regeneration. *Nature*. 2013;494:247-250.
83. Dorrell C, Erker L, Schug J, et al. Prospective isolation of a bipotential clonogenic liver progenitor cell in adult mice. *Genes Dev*. 2011;25:1193-1203.
84. Furuyama K, Kawaguchi Y, Akiyama H, et al. Continuous cell supply from a Sox9-expressing progenitor zone in adult liver, exocrine pancreas and intestine. *Nat Genet*. 2011;43:34-41.
85. Espanol-Suner R, Carpentier R, van Hul N, et al. Liver progenitor cells yield functional hepatocytes in response to chronic liver injury in mice. *Gastroenterology*. 2012;143:1564-1575.
86. Yanger K, Zong Y, Maggs LR, et al. Robust cellular reprogramming occurs spontaneously during liver regeneration. *Genes Dev*. 2013;27:719-724.

87. Sawitza I, Kordes C, Reister S, Häussinger D. The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology*. 2009;50:1617-1624.
88. Paku S, Schnur J, Nagy P, Thorgeirsson SS. Origin and Structural Evolution of the Early Proliferating Oval Cells in Rat Liver. *Am J Pathol*. 2001;158:1313-1323.
89. Zajicek G, Oren R, Weinreb M, JR. The streaming liver. *Liver*. 1985;5:293-300.
90. Takase HM, Itoh T, Ino S, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration. *Genes Dev*. 2013;27:169-181.
91. Ishikawa T, Factor VM, Marquardt JU, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling is required for stem-cell-mediated liver regeneration in mice. *Hepatology*. 2012;55:1215-1226.
92. Kitade M, Factor VM, Andersen JB, et al. Specific fate decisions in adult hepatic progenitor cells driven by MET and EGFR signaling. *Genes Dev*. 2013;27:1706-1717.
93. Evarts RP, Hu Z, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Activation of hepatic stem cell compartment in the rat: role of transforming growth factor alpha, hepatocyte growth factor, and acidic fibroblast growth factor in early proliferation. *Cell Growth Differ*. 1993;4:555-561.
94. Hu Z, Evarts RP, Fujio K, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of fibroblast growth factor receptors flg and bek during hepatic ontogenesis and regeneration in the rat. *Cell Growth Differ*. 1995;6:1019-1025.
95. Wei W, Dirsch O, Mclean AL, Zafarnia S, Schwier M, Dahmen U. Rodent models and imaging techniques to study liver regeneration. *Eur Surg Res*. 2015;54:97-113.
96. Martins PNA, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver Int*. 2008;28:3-11.
97. Trautwein C, Will M, Kubicka S, Rakemann T, Flemming P, Manns MP. 2-acetaminofluorene blocks cell cycle progression after hepatectomy by p21 induction and lack of cyclin E expression. *Oncogene*. 1999;18:6443-6453.
98. Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest*. 1994;70:511-516.
99. Ghoshal AK, Mullen B, Medline A, Farber E. Sequential analysis of hepatic carcinogenesis. Regeneration of liver after carbon tetrachloride-induced liver necrosis when hepatocyte proliferation is inhibited by 2-acetylaminofluorene. *Lab Invest*. 1983;48:224-230.

100. Evarts RP, Nagy P, Nakatsukasa H, Marsden E, Thorgeirsson SS. In vivo differentiation of rat liver oval cells into hepatocytes. *Cancer Res.* 1989;49:1541-1547.
101. Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, et al. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. *Hepatology.* 1995;22:1243-1253.
102. Evarts RP, Nagy P, Marsden E, Thorgeirsson SS. A precursor-product relationship exists between oval cells and hepatocytes in rat liver. *Carcinogenesis.* 1987;8:1737-1740.
103. Dusabineza A-C, van Hul NK, Abarca-Quinones J, Starkel P, Najimi M, Leclercq IA. Participation of liver progenitor cells in liver regeneration: lack of evidence in the AAF/PH rat model. *Lab Invest.* 2012;92:72-81.
104. Lemaigre FP. Determining the fate of hepatic cells by lineage tracing: facts and pitfalls. *Hepatology.* 2015;61:2100-2103.
105. DeBaun JR, Rowley JY, Miller EC, Miller JA. Sulfotransferase activation of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene in rodent livers susceptible and resistant to this carcinogen. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1968;129:268-273.
106. Magnus IA, Roe DA, Bhutani LK. Factors affecting the induction of porphyria in the laboratory rat. Biochemical and photobiological studies using diethyl-1,4-dihydro-2,4,6-trimethyl-pyridine-3,5-dicarboxylate (DDC) as a porphyrogenic agent. *J Invest Dermatol.* 1969;53:400-413.
107. Guest I, Ilic Z, Sell S. Age dependence of oval cell responses and bile duct carcinomas in male fischer 344 rats fed a cyclic choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Hepatology.* 2010;52:1750-1757.
108. Jors S, Jeliaskova P, Ringelhan M, et al. Lineage fate of ductular reactions in liver injury and carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2015;125:2445-2457.
109. Yimlamai D, Christodoulou C, Galli GG, et al. Hippo pathway activity influences liver cell fate. *Cell.* 2014;157:1324-1338.
110. Yanger K, Knigin D, Zong Y, et al. Adult hepatocytes are generated by self-duplication rather than stem cell differentiation. *Cell Stem Cell.* 2014;15:340-349.
111. Raven A, Lu W-Y, Man TY, et al. Cholangiocytes act as facultative liver stem cells during impaired hepatocyte regeneration. *Nature.* 2017;547:350-354.
112. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* 1970;3:393-403.
113. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok, IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic

- tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17:331-340.
114. Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 1988;136:42-60.
 115. Pittenger MF, Am Mackay, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
 116. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119:2204-2213.
 117. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
 118. Li M, Ikehara S. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells Int*. 2013;2013:132642.
 119. Houlihan DD, Mabuchi Y, Morikawa S, et al. Isolation of mouse mesenchymal stem cells on the basis of expression of Sca-1 and PDGFR- α . *Nat Protoc*. 2012;7:2103-2111.
 120. Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, et al. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*. 2009;206:2483-2496.
 121. Bühring H-J, Battula VL, Trembl S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1106:262-271.
 122. Bautch VL. Stem cells and the vasculature. *Nat Med*. 2011;17:1437-1443.
 123. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008;3:301-313.
 124. Rouget C. Mémoire sur le développement, la structure et les propriétés physiologique des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch Physiol norm path*. 1873;6:603.
 125. Ashton N, Oliveira F de. Nomenclature of pericytes. Intramural and extramural. *Br J Ophthalmol*. 1966;50:119-123.
 126. Farini A, Sitzia C, Erratico S, Meregalli M, Torrente Y. Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases. *Stem Cells Int*. 2014;2014:306573.
 127. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, et al. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol*. 2005;11:7461-7465.
 128. Aurich I, Mueller LP, Aurich H, et al. Functional integration of hepatocytes derived from human mesenchymal stem cells into mouse livers. *Gut*. 2007;56:405-415.

129. Chamberlain J, Yamagami T, Colletti E, et al. Efficient generation of human hepatocytes by the intrahepatic delivery of clonal human mesenchymal stem cells in fetal sheep. *Hepatology*. 2007;46:1935-1945.
130. Sato Y, Araki H, Kato J, et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. 2005;106:756-763.
131. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest*. 2002;109:1291-1302.
132. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*. 2013;2013:496218.
133. Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K, et al. Recruitment of bone-marrow-derived cells by skeletal and cardiac muscle in adult dystrophic mdx mice. *Anat Embryol (Berl)*. 1999;199:391-396.
134. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 1999;284:1168-1170.
135. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest*. 2002;109:337-346.
136. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705.
137. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001;107:1395-1402.
138. Meurer SK, Tihaa L, Lahme B, Gressner AM, Weiskirchen R. Identification of endoglin in rat hepatic stellate cells: new insights into transforming growth factor beta receptor signaling. *J Biol Chem*. 2005;280:3078-3087.
139. Trim N, Morgan S, Evans M, et al. Hepatic Stellate Cells Express the Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor p75 and Undergo Apoptosis in Response to Nerve Growth Factor Stimulation. *Am J Pathol*. 2000;156:1235-1243.
140. Fujio K, Evarts RP, Hu Z, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, during liver regeneration from putative stem cells in adult rat. *Lab Invest*. 1994;70:511-516.
141. Kordes C, Sawitza I, Müller-Marbach A, et al. CD133+ hepatic stellate cells are progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352:410-417.
142. Crisan M, Corselli M, Chen WCW, Peault B. Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. 2012;16:2851-2860.

143. Lepperdinger G. Inflammation and mesenchymal stem cell aging. *Curr Opin Immunol.* 2011;23:518-524.
144. Castilho-Fernandes A, Almeida DC de, Fontes AM, et al. Human hepatic stellate cell line (LX-2) exhibits characteristics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Mol Pathol.* 2011;91:664-672.
145. Kordes C, Sawitza I, Götze S, Häussinger D. Stellate cells from rat pancreas are stem cells and can contribute to liver regeneration. *PLoS ONE.* 2012;7:e51878.
146. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007;25:2739-2749.
147. Fong ELS, Chan CK, Goodman SB. Stem cell homing in musculoskeletal injury. *Biomaterials.* 2011;32:395-409.
148. Smith A. Cell therapy: in search of pluripotency. *Curr Biol.* 1998;8:802-804.
149. Shafritz DA. Stem Cells and Liver Repopulation: Current Reality and Prospects for the Future. In: Okita K, ed. *Stem Cells and Liver Regeneration.* Tokyo, Japan. 2004:41-50.
150. Kordes C, Häussinger D. Hepatic stem cell niches. *J Clin Invest.* 2013;123:1874-1880.
151. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.* 1978;4:7-25.
152. Yang L, Jung Y, Omenetti A, et al. Fate-mapping evidence that hepatic stellate cells are epithelial progenitors in adult mouse livers. *Stem Cells.* 2008;26:2104-2113.
153. Michelotti GA, Xie G, Swiderska M, et al. Smoothed is a master regulator of adult liver repair. *J Clin Invest.* 2013;123:2380-2394.
154. Swiderska-Syn M, Syn WK, Xie G, et al. Myofibroblastic cells function as progenitors to regenerate murine livers after partial hepatectomy. *Gut.* 2014;63:1333-1344.
155. Lua I, James D, Wang J, Wang KS, Asahina K. Mesodermal mesenchymal cells give rise to myofibroblasts, but not epithelial cells, in mouse liver injury. *Hepatology.* 2014;60:311-322.
156. Mederacke I, Hsu CC, Troeger JS, et al. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun.* 2013;4:2823.
157. Heldin C-H. Targeting the PDGF signaling pathway in tumor treatment. *Cell Commun Signal.* 2013;11:97.

158. Witte LD, Kaplan KL, Nossel HL, Lages BA, Weiss HJ, Goodman DS. Studies of the release from human platelets of the growth factor for cultured human arterial smooth muscle cells. *Circ Res*. 1978;42:402-409.
159. Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*. 1999;79:1283-1316.
160. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22:1276-1312.
161. Claesson-Welsh L. Signal transduction by the PDGF receptors. *Prog Growth Factor Res*. 1994;5:37-54.
162. Omura T, Heldin C-H, Östman A. Immunoglobulin-like Domain 4-mediated Receptor-Receptor Interactions Contribute to Platelet-derived Growth Factor-induced Receptor Dimerization. *J Biol Chem*. 1997;272:12676-12682.
163. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1378:113.
164. Fantl WJ, Escobedo JA, Williams LT. Mutations of the platelet-derived growth factor receptor that cause a loss of ligand-induced conformational change, subtle changes in kinase activity, and impaired ability to stimulate DNA synthesis. *Mol Cell Biol*. 1989;9:4473-4478.
165. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*. 1991;252:668-674.
166. Pietras K, Sjoblom T, Rubin K, Heldin CH, Ostman A. PDGF receptors as cancer drug targets. *Cancer Cell*. 2003;3:439-443.
167. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996;56:100-104.
168. Carroll M, Ohno-Jones S, Tamura S, et al. CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood*. 1997;90:4947-4952.
169. Jones RL, Judson IR. The development and application of imatinib. *Expert Opin Drug Saf*. 2005;4:183-191.
170. Lewis NL, Lewis LD, Eder JP, et al. Phase I study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of oral CP-868,596, a highly specific platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor in patients with advanced cancers. *J Clin Oncol*. 2009;27:5262-5269.

171. Ramachandran A, Marshall H, Jain V. Crenolanib, a novel Type I, mutant-specific inhibitor of Class III receptor tyrosine kinases, preferentially binds to phosphorylated kinases. *Cancer Res.* 2014;72:3683.
172. Michael M, Vlahovic G, Khamly K, Pierce KJ, Guo F, Olszanski AJ. Phase Ib study of CP-868,596, a PDGFR inhibitor, combined with docetaxel with or without axitinib, a VEGFR inhibitor. *Br J Cancer.* 2010;103:1554-1561.
173. Clinical Trial NCT01229644. A Phase II Study of Crenolanib (CP-868,596), a Selective and Potent Inhibitor of PDGFR, for the Treatment of Adult Gliomas. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01229644>.
174. Clinical Trial NCT01243346. Phase II Study of Crenolanib (CP-868,596), for the Treatment of Patients With Advanced Gastrointestinal Stromal Tumors With the D842-related Mutations and Deletions in the PDGFRA Gene. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01243346>.
175. Clinical Trial NCT01393912. PDGFR Inhibitor Crenolanib in Children/Young Adults With Diffuse Intrinsic Pontine Glioma or Recurrent High-Grade Glioma. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01393912>.
176. Clinical Trial NCT01522469. Phase II Study of Crenolanib in Subjects With Relapsed/Refractory AML With FLT3 Activating Mutations. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01522469>.
177. Clinical Trial NCT01657682. A Phase II Study of Crenolanib in Relapsed/Refractory Acute Myeloid Leukemia Patients With FLT3 Activating Mutations. <https://www.clinicaltrials.gov/show/NCT01657682>.
178. Smith CC, Lasater EA, Lin KC, et al. Crenolanib is a selective type I pan-FLT3 inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:5319-5324.
179. Galanis A, Ma H, Rajkhowa T, et al. Crenolanib is a potent inhibitor of FLT3 with activity against resistance-conferring point mutants. *Blood.* 2014;123:94-100.
180. Pinzani M, Milani S, Herbst H, et al. Expression of platelet-derived growth factor and its receptors in normal human liver and during active hepatic fibrogenesis. *Am J Pathol.* 1996;148:785-800.
181. Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest.* 1989;84:1780-1785.
182. Pinzani M, Knauss TC, Pierce GF, et al. Mitogenic signals for platelet-derived growth factor isoforms in liver fat-storing cells. *Am J Physiol.* 1991;260:C485-491.

183. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest.* 1989;84:1786-1793.
184. Kocabayoglu P, Zhang DY, Kojima K, Hoshida Y, Friedman SL. Induction and Contribution of β -PDGFR Signaling by Hepatic Stellate Cells to Liver Regeneration after Partial Hepatectomy in Mice. *Liver Int.* 2016;36:874-882.
185. Jin Y, Zhang W, Liu Y, et al. rhPDGF-BB via ERK pathway osteogenesis and adipogenesis balancing in ADSCs for critical-sized calvarial defect repair. *Tissue Eng Part A.* 2014;20:3303-3313.
186. Artemenko Y, Gagnon A, Aubin D, Sorisky A. Anti-adipogenic effect of PDGF is reversed by PKC inhibition. *J Cell Physiol.* 2005;204:646-653.
187. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001;7:211-228.
188. Nazari M, Ni NC, Ludke A, et al. Mast cells promote proliferation and migration and inhibit differentiation of mesenchymal stem cells through PDGF. *J Mol Cell Cardiol.* 2016;94:32-42.
189. Qu B, Xia X, Wu H-h, Tu C-q, Pan X-m. PDGF-regulated miRNA-138 inhibits the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;448:241-247.
190. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
191. Tsao MS, Smith JD, Nelson KG, Grisham JW. A diploid epithelial cell line from normal adult rat liver with phenotypic properties of 'oval' cells. *Exp Cell Res.* 1984;154:38-52.
192. Ballardini G, Groff P, Badiali dGL, Schuppan D, Bianchi FB. Ito cell heterogeneity: desmin-negative Ito cells in normal rat liver. *Hepatology.* 1994;19:440-446.
193. Ramm GA, Britton RS, O'Neill R, Blaner WS, Bacon BR. Vitamin A-poor lipocytes: a novel desmin-negative lipocyte subpopulation, which can be activated to myofibroblasts. *Am J Physiol.* 1995;269:G532-G541.
194. Aurich H, Sgotta M, Kaltwasser P, et al. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo. *Gut.* 2009;58:570-581.
195. Chen Q, Lu M, Monks BR, Birnbaum MJ. Insulin Is Required to Maintain Albumin Expression by Inhibiting Forkhead Box O1 Protein. *J Biol Chem.* 2016;291:2371-2378.

196. Yoshiji H, Noguchi R, Kuriyama S, et al. Imatinib mesylate (STI-571) attenuates liver fibrosis development in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G907-13.
197. Wang Y, Weil BR, Herrmann JL, et al. MEK, p38, and PI-3K mediate cross talk between EGFR and TNFR in enhancing hepatocyte growth factor production from human mesenchymal stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009;297:C1284-93.
198. Aenlle KK, Curtis KM, Roos BA, Howard GA. Hepatocyte growth factor and p38 promote osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mol Endocrinol*. 2014;28:722-730.
199. Li J, Zhao Z, Liu J, et al. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. *Cell Prolif*. 2010;43:333-343.
200. Lu T, Yang C, Sun H, Lv J, Zhang F, Dong XJ. FGF4 and HGF promote differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes via the MAPK pathway. *Genet Mol Res*. 2014;13:415-424.
201. Lee K-D, Kuo TK-C, Whang-Peng J, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40:1275-1284.
202. Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*. 1995;373:699-702.
203. Brown KD. The epidermal growth factor/transforming growth factor-alpha family and their receptors. *Eur J Gastroen Hepat*. 1995;7:914-922.
204. Krakowski ML, Kritzik MR, Jones EM, et al. Pancreatic Expression of Keratinocyte Growth Factor Leads to Differentiation of Islet Hepatocytes and Proliferation of Duct Cells. *Am J Pathol*. 1999;154:683-691.
205. Itoh N, Nakayama Y, Konishi M. Roles of FGFs As Paracrine or Endocrine Signals in Liver Development, Health, and Disease. *Front Cell Dev Biol*. 2016;4:30.
206. Berg T, Rountree CB, Lee L, et al. Fibroblast growth factor 10 is critical for liver growth during embryogenesis and controls hepatoblast survival via beta-catenin activation. *Hepatology*. 2007;46:1187-1197.
207. Mfopou JK, Chen B, Mateizel I, Sermon K, Bouwens L. Noggin, retinoids, and fibroblast growth factor regulate hepatic or pancreatic fate of human embryonic stem cells. *Gastroenterology*. 2010;138:2233-45.
208. Inagaki T, Choi M, Moschetta A, et al. Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell Metab*. 2005;2:217-225.

209. Pinzani M, Gesualdo L, Sabbah GM, Abboud HE. Effects of platelet-derived growth factor and other polypeptide mitogens on DNA synthesis and growth of cultured rat liver fat-storing cells. *J Clin Invest*. 1989;84:1786-1793.
210. Faux CH, Turnley AM, Epa R, Cappai R, Bartlett PF. Interactions between Fibroblast Growth Factors and Notch Regulate Neuronal Differentiation. *J Neurosci*. 2001;21:5587-5596.
211. Schumacher EC, Götze S, Kordes C, Benes V, Häussinger D. Combined Methylome and Transcriptome Analysis During Rat Hepatic Stellate Cell Activation. *Stem Cells Dev*. 2017;26:1759-1770.
212. Kim BS, Kang H-J, Park J-Y, Lee J. Fucoidan promotes osteoblast differentiation via JNK- and ERK-dependent BMP2-Smad 1/5/8 signaling in human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med*. 2015;47:e128.
213. Liu A, Chen S, Cai S, et al. Wnt5a through noncanonical Wnt/JNK or Wnt/PKC signaling contributes to the differentiation of mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells in vitro. *PLoS ONE*. 2014;9:e90229.
214. Park S-Y, Kang M-J, Han J-S. Interleukin-1 beta promotes neuronal differentiation through the Wnt5a/RhoA/JNK pathway in cortical neural precursor cells. *Mol Brain*. 2018;11:39.
215. Hardwick LJA, Ali FR, Azzarelli R, Philpott A. Cell cycle regulation of proliferation versus differentiation in the central nervous system. *Cell Tissue Res*. 2015;359:187-200.
216. Calegari F, Huttner WB. An inhibition of cyclin-dependent kinases that lengthens, but does not arrest, neuroepithelial cell cycle induces premature neurogenesis. *J Cell Sci*. 2003;116:4947-4955.
217. Lange C, Calegari F. Cdks and cyclins link G1 length and differentiation of embryonic, neural and hematopoietic stem cells. *Cell Cycle*. 2010;9:1893-1900.
218. Ruijtenberg S, van den Heuvel S. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell Cycle*. 2016;15:196-212.
219. Borkham-Kamphorst E, Kovalenko E, van Roeyen CRC, et al. Platelet-derived growth factor isoform expression in carbon tetrachloride-induced chronic liver injury. *Lab Invest*. 2008;88:1090-1100.
220. Kordes C, Sawitza I, Götze S, Schumacher E, Häussinger D. Beyond fibrosis: stellate cells as liver stem cells. *Z Gastroenterol*. 2015;53:1425-1431.
221. Chandrakanthan V, Yeola A, Kwan JC, et al. PDGF-AB and 5-Azacytidine induce conversion of somatic cells into tissue-regenerative multipotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:E2306-15.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Dieter Häussinger, der es mir ermöglichte, diese Doktorarbeit an seiner Klinik unter besten technischen Voraussetzungen und fachlicher Kompetenz zu schreiben und dabei durch wichtige inhaltliche Impulse und Betreuung maßgeblich beteiligt war.

Herrn Dr. Claus Kordes danke ich für die unermüdliche inhaltliche und praktische Anleitung sowohl bei der experimentellen Durchführung als auch bei der Ergebnisauswertung und -präsentation.

Frau Dr. Doreen Reichert danke ich für ihre Unterstützung bei der Durchführung von Immunfluoreszenzaufnahmen sowie bei der Evaluation der Daten.

Die Leberschädigungsmodelle und deren anschließende Analyse mittels quantitativer PCR wurden von Herrn Dr. Claus Kordes, Frau Dr. Iris Sawitza und Frau Dr. Silke Götze durchgeführt. Ich danke Ihnen für die Erlaubnis, diese Ergebnisse zu Beginn meiner Arbeit vorzustellen und für die Vorarbeit, die zu der Entstehung des Themas meiner Doktorarbeit führte sowie die inhaltliche und praktische Anleitung.

Frau Claudia Rupprecht danke ich für die Isolierung der hepatischen Sternzellen aus adulten Ratten. Frau Janina Thies danke ich für die Isolierung von Leberparenchymzellen aus adulten Ratten.

Die hochauflösende Mikroskopie mit dem ELYRA Mikroskop wurde in Kooperation mit Herrn Dr. Boris Görg durchgeführt. Hierbei danke ich insbesondere für die technische Durchführung der Aufnahmen.