

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor/Leiter: Univ.-Prof. Dr. Knoefel

Charakterisierung der Rolle und der zugrundeliegenden Mechanismen von
Thrombozyten bei der Interaktion von CD133+ Knochenmarkstammzellen
(KMSZ) und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1)

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Kristina Kobiela-Wieferich

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jan Schulte am Esch

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Nadja Lehwald-Tywuschik

Für Henri und Matti

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Kongressbeitrag:

1. K. Wieferich, C. Duhme, N. Lehwald, J. Kirchner, M. Schmelzle, N. H. Stoecklein, A. Krieg, W. T. Knoefel, J. Schulte am Esch: P-Selectin und sein Ligand PSGL-1 unterstützen die Adhäsion von CD133+ Knochenmarkstammzellen entlang kapillären Endothels unter Flussbedingungen

Freier Vortrag auf dem 132. Kongress der Gesellschaft für Chirurgie, München 28.04.-01.05.2015

Originalartikel :

1. Nadja Lehwald, Constanze Duhme, Iryna Pinchuk, Julian Kirchner, Kristina Wieferich, Moritz Schmelzle, Kerstin Jurk, Beatrice A. Windmüller, Wolfgang Hübner, Bernhard Homey, Johannes Bode, Ralf Kubitz, Tahar Benhidjeb, Martin Krüger, Simon C. Robson, Wolfram T. Knoefel, Beate E. Kehrel and Jan Schulte am Esch:
Platelets Boost Recruitment of CD133+ Bone Marrow Stem Cells to Endothelium and the Rodent Liver—The Role of P-Selectin/PSGL-1 Interactions

International Journal of Molecular Sciences 2020, 21, 6431;
doi:10.3390/ijms21176431

I. Zusammenfassung

In klinischen Studien konnte die Applikation von CD133+ Knochenmarkstammzellen (KMSZ) nach ausgeprägter Leberteilresektion die Leberregeneration verbessern. Der Mechanismus des Stammzell-*Homings* ist nicht vollends verstanden. Eine begünstigende Rolle könnten hierbei neben Thrombozyten auch P-Selectin und sein Ligand P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) sowie das *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) spielen. Um den zugrundeliegenden Mechanismus des *Homings* der CD133+ KMSZ entlang des Endothels zu untersuchen, wurde zum einen der Effekt von Thrombozyten auf das *Homing* und zum anderen die Rolle von P-Selectin, seinem Liganden PSGL-1 und der Einfluss von PECAM-1 evaluiert.

Humane Endothelzellen - *Human Microvascular Endothelial Cells-1* (HMEC-1) - wurden in Kanälen eines *Live Cell Imaging* Systems kultiviert und anschließend mit Thrombozyten und CD133+ KMSZ bei Scherkräften von 1 dyne/cm² perfundiert. Die KMSZ wurden zuvor mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) aus humanem Knochenmarkpunktat gewonnen. Zunächst wurde die Adhäsion der KMSZ entlang des Endothels unter Co-Inkubation mit *Platelet Rich Plasma* (PRP) bzw. *Platelet Poor Plasma* (PPP) im Kontrollkanal verglichen. In weiteren Experimenten wurden thrombozytäres P-Selectin oder PSGL-1 der Stammzellen inhibiert bzw. der HMEC-1 Monolayer mit PSGL-1 vorinkubiert. Außerdem wurde das Endothel mit PECAM-1 inkubiert bzw. endotheliales PECAM-1 durch einen Antikörper blockiert.

Die Vorinkubation des Endothels mit PRP führte zu einer tendenziellen Steigerung adhärenter CD133+ KMSZ entlang des Endothels um das 12,6 -fache verglichen mit PPP. Die zusätzliche Inkubation des Endothels mit PSGL-1 und die Blockade thrombozytären P-Selectins hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl adhärenter KMSZ. Die Inhibition von PSGL-1 auf den KMSZ führte zu einer signifikanten Reduktion adhärenter KMSZ ($p < 0,05$). Weder die Vorinkubation des Endothels mit PECAM-1 noch dessen Blockade führten zu einer signifikanten Veränderung der Anzahl adhärenter KMSZ.

Zusammenfassend begünstigen Thrombozyten die Adhäsion von CD133+ KMSZ entlang des mikrovaskulären Endothels unter Flussbedingungen. Für die Adhäsion ist auf den KMSZ exprimiertes PSGL-1 wichtig. Thrombozytäres P-Selectin scheint ebenso wie PECAM-1 eine untergeordnete Rolle im Prozess des frühen *Homings* von CD133+ KMSZ zu spielen. Diese Erkenntnisse könnten Ansatzpunkte bieten, die therapeutische Applikation von Stammzellen nach ausgeprägter Leberteilresektion zu optimieren.

II. Summary

In clinical studies application of CD133+ bone marrow stem cells (BMSC) could improve the regeneration of the liver after extended partial resection. The mechanism of stem cell homing isn't fully understood. Thrombocytes as well as p-selectin, its ligand p-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and platelet endothelial cell adhesion molecule -1 (PECAM-1) could positively influence that process.

To study the underlying mechanisms of CD133+ BMSC homing over endothelial vasculature the effect of thrombocytes as well as the role of p-selectin and its ligand PSGL-1 and the influence of PECAM-1 were evaluated.

Human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1) were cultured in capillaries of a live cell imaging system and then co-cultured with thrombocytes and CD133+ BMSC using shear forces of 1 dyne/cm². BMSC were purified from human bone marrow aspirates using magnetic activated cell sorting (MACS). Initially the difference in adherence of BMSC to microvasculature using platelet rich plasma (PRP) was compared to co-incubation with platelet poor plasma (PPP). In the following thrombocytic p-selectin and PSGL-1 on stem cells were inhibited as well as HMEC-1 pre-incubated with PSGL-1. Furthermore microvasculature was pre-incubated with PECAM-1 and endothelial PECAM-1 was blocked by an antibody.

Pre-incubation of microvasculature with PRP showed an increased number of adherent CD133+ BMSC by trend by 12.6 times compared to PPP. Neither incubation of microvasculature with PSGL-1 nor blocking of thrombocytic p-selectin influenced the number of adherent BMSC significantly. Inhibition of PSGL-1 on BMSC caused a significant reduction of adherent BMSC ($p < 0.05$). Neither pre-incubation of endothelial cells with PECAM-1 nor its blocking showed a significant alteration in adherence of BMSC.

Thrombocytes promote adhesion of CD133+ BMSC along microvasculature under shear conditions. PSGL-1 on BMSC plays an important role in adherence. Thrombocytic p-selectin as well as PECAM-1 seem to play a minor role in the process of early homing of CD133+ BMSC. These findings might help to optimize therapeutical application of stem cells following extended partial resection of the liver.

III. Abkürzungsverzeichnis

%	Procent
°	Grad
°C	Grad Celcius
+	positiv
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophcocyanin
Ca ²⁺	Calcium
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy	Cyanin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEPC	embryonale Endotheliale Vorläuferzelle
EPC	Endotheliale Vorläuferzelle
E-Selectin	endotheliales Selectin
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FcR	<i>fragment crystallizable receptor</i>

FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>Forward Scatter</i>
g	Beschleunigungsgröße der Zentrifuge
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HMEC-1	<i>Human Microvascular Endothelial Cell - 1</i>
HPC	<i>Hepatic Progenitor Cell</i>
HSEC	<i>Human hepatic sinusoidal endothelial cells</i>
HSZ	hämatopoetische Stammzelle
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cell</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule - 1</i>
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IMO	inflammatorische Monozyten
INR	<i>International Normalized Ratio</i>
IPMN	intraduktale papillär-muzinöse low-grade Neoplasie des Pancreas
KM	Knochenmark
KMSZ	Knochenmarkstammzellen
L-Selectin	lymphozytäres Selectin

MACS	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
n	Anzahl
NET	Neuroendokriner Tumor
p	Signifikanzniveau
Pa	Pascal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule - 1</i>
PEV	<i>Platelet-derived extracellular vesicles</i>
PHx	Partielle Hepatektomie
PMC	Platelet Monocyte Complexes
PMN	Polymorphonukleare Neutrophile
PPP	<i>Platelet Poor Plasma</i>
PRP	<i>Platelet Rich Plasma</i>
P-Selectin	<i>Platelet Selectin</i>
PSGL-1	P-Selectin-Glykoprotein-Ligand - 1
PVE	Portalvenöse Embolisation
SD	Standardabweichung
SDF1-α	<i>Stromal Cell-Derived Factor 1 alpha</i>
SCGF	<i>Stem Cell Growth Factor</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>

SZ	Stammzellen
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule – 1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR-2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>
ZVK	Zentraler Venenkatheter
ZZ	Zellzahl

IV. Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung	1
1.1	Leberregeneration – klinische Relevanz.....	1
1.2	Knochenmarkstammzellen und Leberregeneration	1
1.2.1	Mechanismen	1
1.2.2	Potenzial CD133+ KMSZ.....	3
1.3	Beteiligung von Thrombozyten	4
1.4	P-Selectin/PSGL-1.....	5
1.5	PECAM-1.....	6
1.6	Einfluss von <i>Shear Stress</i> auf die Thrombozytenaktivität.....	7
1.7	Ziele der Arbeit	8
2	Material	9
2.1	Patienten und Patientinnen.....	9
2.2	Zellen.....	10
2.3	Chemikalien.....	10
2.4	Kits.....	11
2.5	Antikörper	12
2.6	Verbrauchsmaterialien.....	13
2.7	Hardware	14
2.8	Software	15
3	Methoden.....	16
3.1	Zellkultur	16
3.2	Knochenmark-Punktion	17
3.3	Aufbereitung des Knochenmarks.....	17

3.3.1	Gewinnung mononukleärer Zellen.....	17
3.3.2	Separation der CD133+ KMSZ.....	18
3.4	Thrombozyten Gewinnung.....	19
3.5	Versuche unter Flussbedingungen mit Hilfe eines <i>Live Cell Imaging</i> <i>Systems</i> (BioFlux 200).....	20
3.5.1	Einbringen der Endothelzellen in die Versuchsplatten.....	21
3.5.2	Versuchsablauf.....	22
3.6	Auswertung.....	26
3.7	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	27
3.7.1	Grundprinzip.....	27
3.7.2	Cellsorting.....	28
3.7.3	FACS-Färbung	28
3.8	Statistische Auswertung	29
4	Ergebnisse.....	30
4.1	Auswertung Patientenkollektiv.....	30
4.1.1	Allgemeine Daten	30
4.1.2	Laborparameter	30
4.2	FACS-Analyse	32
4.3	Versuche unter Flussbedingungen im <i>Mikrofluidic</i> -System (Bioflux200)	35
4.3.1	Einfluss der Co-Inkubation mit thrombozytenreichem Plasma (PRP) im Vergleich zu thrombozytenarmen Plasma (PPP) auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel.....	35
4.3.2	Einfluss der P-Selectin/PSGL-1-Achse auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel	37
4.3.3	Einfluss von PECAM-1 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ entlang	

des Endothels.....	42
5 Diskussion	45
5.1 Thrombozyten unterstützen die Anheftung von CD133+ KMSZ an das mikrovaskuläre Endothel.....	46
5.2 Einfluss von P-Selectin/PSGL-1 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ.....	48
5.2.1 Inkubation des Endothelmonolayers mit PSGL-1 führt zu einer tendenziellen Abnahme der Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ.....	48
5.2.2 Die Blockade von thrombozytärem P-Selectin führt zu keiner signifikanten Reduktion adhärenter CD133+ KMSZ	49
5.2.3 Die Blockade von PSGL-1 an der Zelloberfläche der KMSZ führt zu einer Abnahme der Adhäsion von CD133+ KMSZ	50
5.3 PECAM-1/CD 31 hat keinen signifikanten Einfluss auf das frühe <i>Homing</i> von CD133+ KMSZ.....	52
5.4 Patientenkollektiv – inhomogene Voraussetzungen	53
5.5 Schlussfolgerung	54
Literaturverzeichnis	55
Danksagung.....	

1 Einleitung

1.1 Leberregeneration – klinische Relevanz

Die Regenerationsfähigkeit der Leber ist ein komplexer und faszinierender Mechanismus, dessen Abläufe bis heute noch nicht vollends verstanden sind. Genauere Kenntnisse über die Abläufe sind jedoch von großer klinischer und therapeutischer Bedeutung.

Als Quellen der Regenerationsfähigkeit werden allgemein drei Zellgruppen unterschieden. Adulte Hepatozyten, *Hepatic Progenitor Cells* (HPCs) und extrahepatische Stammzellen. Adulte Hepatozyten tragen durch Hypertrophie und durch kompensatorische Hyperplasie zur Regeneration bei. Dies kommt u.a. nach partieller Hepatektomie (PHx) zum Tragen. Dabei spielt das Resektionsausmaß eine wichtige Rolle (Miyaoka and Miyajima, 2013). Bei gestörter hepatozytärer Funktion, z.B. durch einen chronischen Leberschaden, übernehmen sogenannte *Hepatic Progenitor Cells*, auch *Oval Cells (im Nager)*, die Regeneration. Sie gelten als intrahepatische Stammzellen (SZ), die in den Hering Kanälchen der Leber angesiedelt sind und sich sowohl zu Hepatozyten als auch zu Cholangiozyten differenzieren können (Alison et al., 2009, Sadri et al., 2016). Zur Gruppe der extrahepatischen Stammzellen zählen die Knochenmarkstammzellen (KMSZ). Dabei werden hämatopoetische Stammzellen (HSZ), mesenchymale Stammzellen und endotheliale Vorläuferzellen (EPC) unterschieden. Außerdem wird das Potenzial embryonaler Stammzellen, *Induced Pluripotent Stem Cells* und das Potenzial u.a. aus Nabelschnurblut gewonnenen Stammzellen, Hepatozyten zu ersetzen, erforscht (Tsolaki and Yannaki, 2015).

Auf welche Art und Weise KMSZ die Leberregeneration fördern ist noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand von Diskussionen.

1.2 Knochenmarkstammzellen und Leberregeneration

1.2.1 Mechanismen

Erste Hinweise, dass Hepatozyten aus KMSZ entstehen können, lieferten im Jahr 2000 Theise et al. und Alison et al. In der Studie von Theise erhielten weibliche Mäuse nach Bestrahlung eine Knochenmarktransplantation von männlichen Mäusen. Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnten Hepatozyten nachgewiesen werden, die über ein Y-Chromosom verfügten. Daraus wurde geschlossen, dass KMSZ sich zu Hepatozyten differenzieren können und dadurch eine Rolle in der Leberregeneration spielen. Da die Bestrahlung die Leber kaum beschädigte, stellte die Arbeitsgruppe

außerdem die These auf, dass die Proliferation adulter Hepatozyten die Hauptquelle der Leberregeneration ist, aber KMSZ möglicherweise auch bei leichter Leberschädigung bzw. unter physiologischen Bedingungen zur Regeneration beitragen (Theise et al., 2000). Alison et al. konnten Ähnliches an humanen Lebern nachweisen. Sie fanden Y-Chromosom positive Hepatozyten sowohl in Lebern von Frauen, die eine Knochenmarktransplantation eines männlichen Spenders erhalten hatten als auch in Lebern, die Männern von weiblichen Spendern transplantiert worden waren (Alison et al., 2000). In einer weiteren Studie zeigte sich ebenfalls, dass Hepatozyten aus KMSZ entstehen können. Dabei wurde weiter spezifiziert, dass es sich bei den KMSZ ausschließlich um hämatopoetische Stammzellen handelt (Lagasse et al., 2000). Andere Studien legen jedoch nahe, dass auch mesenchymale KMSZ die Leberfunktion z.B. bei Leberzirrhose positiv beeinflussen können und vorteilhafte Eigenschaften für die klinische Anwendung besitzen (Eom et al., 2015).

In den Studien von Theise und Alison wird davon ausgegangen, dass die KMSZ durch Transdifferenzierung Hepatozyten generieren. Auch andere Studien suggerieren, dass hämatopoetische KMSZ sich durch Stammzellplastizität zu Hepatozyten differenzieren können (Jang et al., 2004). Im Gegensatz dazu stehen Arbeiten, welche die Zellfusion als wahrscheinlichsten Mechanismus der Entstehung von Hepatozyten aus KMSZ postulieren (Vassilopoulos et al., 2003, Wang et al., 2003a). Harris et al. zeigten, dass Hepatozyten nicht zwingend durch Zellfusion entstehen (Harris et al., 2004).

Eine weitere Möglichkeit, die in Betracht gezogen wird, ist die Beteiligung von KMSZ durch parakrine Effekte und Bereitstellung von Wachstumsfaktoren (Kallis et al., 2007, Thorgeirsson and Grisham, 2006). Tsolaki et al. testeten den Einfluss verschiedener Medikamente zur Mobilisation von KMSZ auf Leberfibrose in Mäusen. Die Leberfibrose besserte sich in allen Versuchsgruppen erheblich. Dies konnte allerdings nicht auf die Entstehung von Hepatozyten aus KMSZ zurückgeführt werden. Das Resultat spricht für einen parakrinen Effekt der KMSZ, der die organeigene Regeneration anregt. Möglich ist jedoch auch, dass mobilisierende Medikamente selbst die Proliferation der Hepatozyten und damit die Leberregeneration anregen (Tsolaki et al., 2014). Studien zur kardialen Fibrose legen ebenfalls parakrine Effekte der KMSZ nahe (Kishore et al., 2013).

Bis heute ist noch nicht abschließend geklärt, auf welche Art und Weise KMSZ *in vivo* beteiligt sind. Die Transdifferenzierung scheint unter geeigneten Bedingungen und ausreichendem Selektionsstress jedoch möglich zu sein und mag ein Ansatzpunkt neuer therapeutischer Konzepte sein.

1.2.2 Potenzial CD133+ KMSZ

Das Antigen CD133 wird von hämatopoetischen Stammzellen exprimiert (Yin et al., 1997). Sie können sowohl hämatopoetische als auch epitheliale Zellen hervorbringen. CD133 positive (+) Zellen, die nach Stimulation mit Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) aus peripherem Blut gewonnen wurden, konnten sich unter bestimmten Kulturbedingungen *in vitro* zu epithelialen Zellen differenzieren. Verwendet wurden *Stem Cell Growth Factor* (SCGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Gehling et al., 2000).

Gehling et al. zeigten, dass nach partieller Hepatektomie (PHx) eine signifikante Mobilisation von CD133+ und CD14+ KMSZ ins periphere Blut stattfand. Nach anderen abdominalchirurgischen Eingriffen konnte dies nicht beobachtet werden (Gehling et al., 2005). Eine andere Gruppe stellte ebenfalls die Mobilisation hämatopoetischer Stammzellen (CD133+ und CD34+ KMSZ) fest. Sie unterschieden dabei zwischen einer Mobilisation nach Lebertransplantation und PHx. Die Transplantation stellte einen deutlich stärkeren Reiz für die Mobilisation dar (Lemoli et al., 2006). Damit gehen Daten der eigenen Arbeitsgruppe einher, die eine Mobilisation von CD133+ KMSZ abhängig vom Ausmaß der PHx zeigten (Lehwald et al., 2014). Dabei spielte es keine Rolle, ob eine chronische Lebererkrankung vorlag oder gesundes Lebergewebe. Dem gegenüber steht eine Studie, bei der eine Mobilisation nur bei großer PHx und vorgeschädigtem Lebergewebe gesehen wurde (Zocco et al., 2011).

CD133+ KMSZ wurden bereits in klinischen Studien erfolgreich verwendet. Bei Patienten/-innen, die sich einer erweiterten PHx unterziehen mussten, applizierte unsere Arbeitsgruppe präoperativ CD133+ KMSZ zusätzlich zur portalvenösen Embolisation (PVE). Es konnte ein um 2,5-fach erhöhtes tägliches Wachstum der verbleibenden Lebersegmente innerhalb der ersten 14 Tage nach PHx erzielt werden und somit die Zeit bis zur Operation um durchschnittlich 18 Tage verkürzt werden (Furst et al., 2007, am Esch et al., 2005). Die kardiale Applikation von CD133+ KMSZ nach Myokardinfarkt zeigte ebenfalls eine gesteigerte Regeneration (Klein et al., 2004, Pompilio et al., 2004, Stamm et al., 2003). In weiteren Studien wurden CD133+ KMSZ bei Patienten/-innen mit Leberzirrhose appliziert. Andreone et al. stellten eine Verbesserung der Leberfunktion fest, die bis zu drei Monate anhielt. Des Weiteren scheint die Applikation für Patienten/-innen mit einer Child A und B Zirrhose sicher und ohne Nebenwirkungen zu sein (Andreone et al., 2015).

1.3 Beteiligung von Thrombozyten

Thrombozyten sind wichtige Akteure während der primären Hämostase (Sang et al., 2021, Golebiewska and Poole, 2015). Dies ist jedoch nicht die einzige Funktion. Sie spielen außerdem in der Angiogenese (Blair and Flaumenhaft, 2009), der Wundheilung und der Inflammation (Nurden, 2011) eine wichtige Rolle. Ihre zahlreichen Funktionen werden u.a. auf die zahlreichen Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren zurückgeführt, die von Thrombozyten ausgeschüttet werden können. Dazu zählen unter anderem *Stromal Cell-Derived Factor 1α* (SDF1-α) (Massberg et al., 2006), Serotonin und andere (Nurden, 2011), (Gremmel et al., 2016).

Ein weiteres Feld, in dem die Thrombozyten eine Rolle spielen, ist die Leberregeneration. Erste Hinweise auf die Beteiligung von Thrombozyten an diesem Prozess gab es 1996. Zusätzlich zur PHx splenektomierte Ratten, mit konsekutiver Thrombozytose, zeigten eine bessere Leberregeneration als die Kontrollgruppe ohne Splenektomie (Tomikawa et al., 1996). Dahingegen löste eine Thrombozytopenie eine verminderte hepatische Regeneration nach PHx aus (Lesurtel et al., 2006). Dieselbe Studie stellte außerdem die Hypothese auf, dass thrombozytäres Serotonin ein wichtiger Faktor für die Leberregeneration ist. Nocito et al. stellten diese Zusammenhänge auch für die Prozesse nach Ischämie der Leber fest (Nocito et al., 2007). Murata und Kollegen zeigten, dass Thrombozyten sich früh nach PHx in der Leber ansiedeln und bei Thrombozytopenie die Regeneration der Leber beeinträchtigt ist. Sie führten dies auf die verminderte Aktivierung von Signalwegen, die zur Proliferation beitragen, zurück. Eine Thrombozytose hatte dagegen auch hier einen positiven Einfluss auf die Regeneration (Murata et al., 2007). In einer weiteren Studie konnte die gleiche Gruppe die Leberregeneration nach PHx bei Ratten mit Leberzirrhose durch die Gabe von Thrombopoetin und dadurch erhöhte Thrombozytenlevel verbessern (Murata et al., 2008). Retrospektive Studien implizieren, dass eine niedrige postoperative Thrombozytenzahl nach PHx mit einer verzögerten Erholung der Leberfunktion einhergeht (Alkozai et al., 2010) und nach einer Lebertransplantation einen Risikofaktor für eine Transplantatdysfunktion darstellt (Li et al., 2015).

Zum einen weisen Studien darauf hin, dass Thrombozyten selbst durch Stimulation der Hepatozyten durch Internalisation oder Ausschüttung verschiedener Faktoren die Leberregeneration fördern (Meyer et al., 2015, Nowatari et al., 2012), zum anderen sind sie am Prozess des *Homings* von Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt. So beobachteten De Boer und Kollegen, dass Thrombozyten in einem *ex vivo* Modell unter Flussbedingungen die Bindung von CD34+ KMSZ an verletztes Endothel begünstigen.

Diese Bindung wurde durch thrombozytäres P-Selectin vermittelt, an welches die CD34+ KMSZ über P-Selectin Glycoprotein Ligand -1 (PSGL-1) binden konnten. Ohne Thrombozyten fand nur eine begrenzte Bindung an das Endothel statt (de Boer et al., 2006). Das stimmt mit Erkenntnissen von Massberg et al. überein, die mittels intravitaler Video Fluoreszenz Mikroskopie zeigten, dass Thrombozyten unerlässlich für das *Homing* von CD34+ KMSZ an Orte vaskulärer Verletzungen sind (Massberg et al., 2006). Lev et al. bestätigten diesen Zusammenhang auch für CD133+ und *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* positive KMSZ (VEGFR-2+ KMSZ) (Lev et al., 2006). Darüber hinaus stimulieren Thrombozyten die Differenzierung von EPCs aus dem Knochenmark (KM) zu endothelialen Zellen (Langer et al., 2006, Massberg et al., 2006).

1.4 P-Selectin/PSGL-1

Platelet (P) Selectin ist ein Zelladhäsionsmolekül, das zur Familie der Selectine gehört. Es kommt in Thrombozyten, Megakaryozyten und vaskulären Endothelzellen vor. Das thrombozytäre P-Selectin wird in ihren α -Granula gespeichert und bei Aktivierung der Thrombozyten an der Oberfläche präsentiert. In Endothelzellen dienen Weibel-Palade-Körperchen als Speicher (McEver et al., 1989, Stenberg et al., 1985).

P-Selectin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL-1) ist der Hauptligand für P-Selectin. Er wird vorwiegend von hämatopoetischen Zellen exprimiert (Laszik et al., 1996). Neben CD34+ KMSZ exprimieren auch Lymphozyten, dendritische Zellen und myeloische Zellen während ihrer Differenzierung im KM den Liganden. Zirkulierende neutrophile (Moore et al., 1994, Moore et al., 1992) und eosinophile Granulozyten (Symon et al., 1996) exprimieren ebenfalls den Liganden. Erythrozyten und Megakaryozyten hingegen verlieren den Liganden während ihrer Entwicklung (Laszik et al., 1996). Andere fanden PSGL-1 auch auf Thrombozyten (Frenette et al., 2000). Neben P-Selectin kann PSGL-1 auch lymphozytäres (L) Selectin und endotheliales (E) Selectin binden (Katayama et al., 2003, McEver, 2002).

Die Bindung von PSGL-1 an P-Selectin ist Calcium (Ca^{2+}) abhängig (Moore et al., 1992). Thrombozytäres PSGL-1 kann P-Selectin auf aktiviertem Endothel binden und ist somit an der Interaktion von Endothel und Thrombozyten beteiligt (Frenette et al., 2000). Moore et al. postulierten, dass PSGL-1 zum einen für die Bindungen zwischen Leukozyten und P-Selectin mit hoher Affinität notwendig ist und zum anderen für das *Rolling* von neutrophilen Granulozyten. Das galt sowohl unter statischen Bedingungen als auch unter Flussbedingungen. Durch die Blockade von PSGL-1 mit einem Antikörper konnten die

Bindungen nicht entstehen (Moore et al., 1995). Auf CD34+ KMSZ ist PSGL-1 der einzige Ligand, der P-Selectin binden kann (Levesque et al., 1999).

Wie bereits erwähnt, vermitteln Thrombozyten durch die P-Selectin/PSGL-1-Achse die Adhäsion von CD34+ KMSZ an Endothelläsionen (de Boer et al., 2006). In der gleichen Studie suggerierte de Boer, dass die Bindung von PSGL-1 der rekrutierten KMSZ außerdem die Bindungsaktivität der KMSZ fördert, da es zur Aktivierung von Adhäsionsmolekülen führt. In *in vitro* Versuchen zeigte sich, dass auch die Bindung von CD133+ und VEGFR-2 positiven endothelialen Vorläuferzellen (EPC) an Thrombozyten von P-Selectin und PSGL-1 abhängig ist (Lev et al., 2006). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PSGL-1 und P-Selectin, ebenso wie Thrombozyten, eine zentrale Rolle im *Homing* von KMSZ an Orten vaskulärer Verletzungen spielen. Andere Studien suggerieren eine Beteiligung am *Homing* von hämatopoetischen SZ in das KM (Frenette et al., 1998, Janowska-Wieczorek et al., 2001, Hidalgo et al., 2002). In diesem Zusammenhang wird impliziert, dass PSGL-1 auf hämatopoetischen Vorläuferzellen außerdem als Signalmolekül fungieren kann. Dabei hat die Bindung an P-Selectin einen inhibitorischen Einfluss auf die Hämatopoese (Levesque et al., 1999).

1.5 PECAM-1

Wie P-Selectin zählt das *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1* (PECAM-1) zu den Zelladhäsionsmolekülen. Dabei gehört es zu der Subgruppe der Immunglobuline (Ig) (Newman et al., 1990). PECAM-1 wird an der Zelloberfläche von Thrombozyten, Megakaryozyten, Monozyten, Neutrophilen, Natürlichen Killerzellen und teilweise von T-Zellen exprimiert (Muller et al., 1993, Stockinger et al., 1990, Woodfin et al., 2007) sowie von CD34+ KMSZ (Leavesley et al., 1994). Darüber hinaus ist es an Zelljunctionen endothelialer Zellen zu finden (Muller et al., 1989).

CD133+ KMSZ exprimieren ebenfalls PECAM-1. Die Beobachtung der Differenzierung von CD133+ KMSZ *in vitro* zeigte, dass PECAM-1 zu einem frühen Zeitpunkt entlang der endothelialen Differenzierung exprimiert wird. CD133+ KMSZ, die reich an PECAM-1 waren, zeigten dabei eine besonders hohe Effizienz (Kanayasu-Toyoda et al., 2003).

PECAM-1 ist ein wichtiges Molekül im Prozess der Transmigration von Zellen durch das Endothel. Dieser Prozess ist für Leukozyten bei inflammatorischen Zuständen gut erforscht. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt die Blockade von PECAM-1 zu einer Verminderung der Anzahl transmigrierter Leukozyten und kann so eine akute Inflammation inhibieren (Bogen et al., 1994, Liao et al., 1997, Liao et al., 1995, Muller et al., 1993). Muller et al. verwendeten in ihrer Studie sowohl einen monoklonalen Antikörper

gegen PECAM-1 als auch lösliches rekombinantes PECAM-1. Die Anwendung des Antikörpers auf Endothelzellen führte gleichermaßen zur Reduktion der Transmigration wie die Inkubation der Leukozyten. Die Inkubation der Leukozyten mit löslichem PECAM-1 zeigte ein vergleichbares Ergebnis. Diese Beobachtung spricht für eine vorwiegend homophile Bindung von PECAM-1 während der Transmigration. So bindet leukozytäres PECAM-1 an von Endothelzellen exprimiertes PECAM-1 (Muller et al., 1993), worauf auch andere Studien hinweisen (Dangerfield et al., 2002, Sun et al., 1996). Darüber hinaus konnten auch heterophile Interaktionen nachgewiesen werden (Muller et al., 1992, Sachs et al., 2007).

Beim *Homing* von KMSZ in das KM, z.B. nach KM-Transplantation, spielt PECAM-1 ebenfalls eine Rolle (Voermans et al., 2000, Yong et al., 1998). Donmez und Kollegen postulierten, dass mit steigender PECAM-1 Konzentration die Zeit bis zum Anwachsen von transplantierten Neutrophilen Zellen und Thrombozyten sinkt (Donmez et al., 2013). Eine 2012 veröffentlichte Studie beobachtete für PECAM-1 auch eine Funktion bei der Adhäsion von Monozyten (Hashimoto et al., 2012).

PECAM-1 hat zudem die Funktion eines Signalmoleküls. Unter anderem moduliert es Integrin Funktionen und kann so die Adhäsion von CD34+ KMSZ und T-Zellen verbessern und vermitteln (Leavesley et al., 1994, Tanaka et al., 1992).

1.6 Einfluss von *Shear Stress* auf die Thrombozytenaktivität

In einem Blutgefäß entsteht *Wall Shear Stress* durch die tangentielle Kraft des Blutflusses, die auf das Endothel der Gefäßwand wirkt (Paszkowiak and Dardik, 2003). Als Einheit wird dyne/cm^2 verwendet. Innerhalb der Arterien gilt ein *Shear Stress* von 10-70 dyne/cm^2 als normal. Innerhalb des venösen Systems ein *Shear Stress* von 1-6 dyne/cm^2 (Malek et al., 1999). *Liquid Shear Stress* bezeichnet die Kraft, die in einem tubulären Gefäß auf das Blut selbst wirkt (Kroll et al., 1996).

Shear Stress nimmt Einfluss auf das Endothel (Paszkowiak and Dardik, 2003, Topper and Gimbrone, 1999), beeinflusst aber ebenso die Adhäsion, Aggregation und Signaltransduktion der Thrombozyten (Kroll et al., 1996). *In vitro* veränderten sich, als Zeichen der Thrombozytenaktivierung in antikoaguliertem Blut, unter Einfluss von hohem *Shear Stress* (> 20 Pascal (Pa)) die Anzahl von Thrombozyten, die Expression von thrombozytärem P-Selectin und z.T. die Konzentration von Serotonin (Lu et al., 2013). In einer Untersuchung von Anderson et al. von 1978 mit *Platelet Rich Plasma* (PRP) zeigte sich bei laminarem Fluss eine erhöhte Serotonin-Ausschüttung bei *Shear Stress* über 75 dyne/cm^2 (Anderson et al., 1978).

1.7 Ziele der Arbeit

Es gibt nur eine begrenzte Datenlage wie Stammzellen an der Leberregeneration partizipieren. Die Mechanismen, durch die ein *Homing* der SZ in der Leber stattfindet, sind weitestgehend unbekannt. Genauere Kenntnisse über beteiligte Moleküle und Rezeptoren könnten zum Verständnis der Rolle der KMSZ in der Leberregeneration beitragen und bieten zudem auch die Möglichkeit, die therapeutische Anwendung von KMSZ effektiver zu gestalten.

Klinische Studien weisen darauf hin, dass CD133+ KMSZ die Leberregeneration nach PVE beschleunigen können (am Esch et al., 2005, Furst et al., 2007) und Zustände chronischer Leberschädigung kurzfristig bessern (Andreone et al., 2015)

Ziel dieser Arbeit war es, ein besseres Verständnis der frühen *Homing*-Prozesse entlang von Mikroendothel nach Perfusion mit CD133+ KMSZ unter Flussbedingungen zu erlangen. Dabei lag das Augenmerk zum einen auf der Analyse des Einflusses der P-Selectin/PSGL-1-Achse auf die Adhärenz von CD133+ KMSZ an das kapilläre Endothel, zum anderen sollte der Einfluss von PECAM-1 und seines Antagonisten auf die Adhärenz untersucht werden. Hierfür kamen Co-Kulturmodelle aus humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC-1), CD133+ KMSZ und Thrombozyten zum Einsatz. Unter Flussbedingungen wurden die Interaktionen der CD133+ KMSZ mit dem kapillären Endothel quantifiziert und analysiert. CD133+ KMSZ wurden aus Knochenmarkaspiraten mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) isoliert. Die Qualität der Isolation wurde mittels *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) bestimmt. Die HMEC-1 wurden in Kapillaren eines *Live Cell Imaging Systems* kultiviert.

2 Material

2.1 Patienten und Patientinnen

Tabelle 1 Auflistung der zugrundeliegenden Erkrankungen teilnehmender Personen aufgeteilt in maligne und benigne Erkrankung sowie die Häufigkeit der Erkrankung. Zusätzlich aufgelistet ist die Anzahl an Fällen mit hepatischer Metastasierung.

Erkrankung	Anzahl	hepatisch metastasiert
Maligne		
oberer Gastrointestinaltrakt		
Ösophaguskarzinom	3	
Magenkarzinom	2	
Neuroendokriner Tumor des Duodenum (NET)	1	1
unterer Gastrointestinaltrakt		
Coecumkarzinom	1	1
Sigmakarzinom	1	1
Rektumkarzinom	2	
Pankreaskarzinom	9	1
hepatozelluläres Karzinom (HCC)	1	
Lungenkarzinom	2	
Lungenmetastase bei Nierenzellkarzinom	1	
C-Zell Karzinom der Schilddrüse	1	1
Keimzelltumor des Hodens	1	
Mammakarzinom	1	1
intraduktale papillär-muzinöse low-grade Neoplasie des Pancreas (IPMN)	1	
Benigne		
Pankreatitis/postpankreatitische Raumforderung	3	

Für die Studie wurden KMSZ und Thrombozyten von Patienten und Patientinnen der Klinik für Allgemein- und Viszeral- und Kinderchirurgie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf gewonnen. Die Patienten/-innen wurden im Voraus über die Studie und den Eingriff aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Ein Ethikvotum liegt vor

(Studiennummer 2852). Die Knochenmark-Entnahme erfolgte nach den üblichen Vorgehensweisen und Standards aus der Spina iliaca anterior superior jeweils im Rahmen einer elektiven Operation.

Für die Versuche wurde das Knochenmark (KM) von 30 Patienten/-innen verwendet. 16 der Teilnehmer/-innen waren männlich, 14 waren weiblich. Das durchschnittliche Alter der männlichen Kohorte betrug 58,25 Jahre (maximales Alter 75 Jahre, minimales Alter 20 Jahre). Das durchschnittliche Alter der weiblichen Kohorte betrug 67,29 Jahre (maximales Alter 88 Jahre, minimales Alter 50 Jahre).

Die Patienten/-innen waren jeweils zu einer elektiven Operation im Rahmen einer Grunderkrankung hospitalisiert (Tabelle 1).

2.2 Zellen

Für diese Arbeit wurden dermale Humane Mikrovaskuläre Endothel Zellen (HMEC-1) verwendet. Die Zellen wurden von der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerzmedizin, Experimentelle Hämostaseologie, der Universität Münster bereitgestellt.

2.3 Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

Name	Hersteller
Ammoniumchloridlösung (isoton)	Zentralapotheke Uni-Klinikum Düsseldorf
autoMACS Running Buffer – MACS Separation Buffer	Miltenyi
Destilliertes Wasser	Gibco Thermo Fisher Scientific
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines	Gibco Thermo Fisher Scientific
Epidermal Growth Factor	Sigma-Aldrich
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate	Sigma-Aldrich
Fibronectin Human	Corning

Name	Hersteller
Ficoll-Paque™ Plus	GE Healthcare
Heparin-Natrium-25.000	Ratiopharm
Hydrocortisone	Sigma-Aldrich
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium Kit enhanced	Pellobiotech
Trypan Blue Stain 0,4%	Gibco Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA 0,05%	Gibco Thermo Fisher Scientific

EDTA = Ethyldiamintetraessigsäure, MACS = *Magnetic Activated Cell Sorting*

2.4 Kits

Tabelle 3 Kits

Kit	Zusammensetzung	Hersteller
CD133 MicroBead Kit human	2 ml CD133 MicroBeads, human 2 ml FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec
Microvascular Endothelial Cell Growth Medium Kit enhanced	500 ml Basal Medium bFGF EGF Long R3 IGF-1 VEGF Hydrocortisone 5% FCS L-Glutamine	Pellobiotech

CD = *Cluster of Differentiation*, FcR = *fragment crystallizable receptor*, bFGF = *basic Fibroblast Growth Factor*, EGF = *Epidermal Growth Factor*, IGF-1 = *Insulin Like Growth Factor 1*, VEGF = *Vascular Endothelial Growth Factor*, FCS = *fetal calf serum*

2.5 Antikörper

Tabelle 4 Antikörper

Name, Cat.#	Hersteller
Versuche	
Monoclonal Antibody CD162, #IM2090	Beckman Coulter
PECAM 1.3 IgG	Blood Center of Wisconsin
KF 38789, #2748	R&D Systems/Tocris
Recombinant Human CD31/PECAM-1, #ADP6	R&D Systems
Recombinant Human PSGL-1/CD162 Fc Chimera, #3345-PS	R&D Systems
<i>Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)</i>	
anti-CD39/FITC, #188-040	Ancell
FITC Mouse IgG1 κ Isotype Control, #554679	BD Biosciences
CD34 APC (8G12), # 340667	BD Biosciences
APC Mouse IgG1 κ Isotype Control, #554681	BD Biosciences
PE-Cy TM 7 Mouse Anti-Human CD45, #557748	BD Biosciences
PE-Cy TM 7 Mouse IgG1 κ Isotype Control, #557872	BD Biosciences

Name, Cat.#	Hersteller
CD133/2 (293C3)-PE human, #130-090-853	Miltenyi Biotech
Mouse IgG2b-PE, # 130-092-215	Miltenyi Biotech

CD = *Cluster of Differentiation*, PECAM = *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*, Ig = *Immunglobulin*, KF38789 = *P-Selectin Inhibitor*, PSGL-1 = *P-Selectin Glykoprotein Ligand 1*, fc= *fragment crystalizable*, FITC = *Fluoresceinisothiocyanat*, APC = *Allophycocyanin*, PE = *Phycoerythrin*, Cy = *Cyanine*

2.6 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
100 µm Filter	FALCON
BD Vacutainer REF 364305 mit Buffered Sodium Citrate 0,3 ml	BD Biosciences
BioFlux 48 Well Plate	Fluxion / IUL Biosystems GmbH
Cellstar Tubes 50 ml	Greiner Bio One Cellstar
Cellstar Tubes 15 ml	Greiner Bio One Cellstar
MACS MS-Column	Miltenyi Biotech
Pre-Separation Filter 30 µm	Miltenyi Biotech
Pipettenspitzen	TipOne Star Lab
Poystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences
Stripetten	Corning
Stripette 2 ml	Greiner Bio One Cellstar
Zellkulturflasche 25 cm ²	Greiner Bio One Cellstar
Zellkulturflasche 75 cm ²	Greiner Bio One Cellstar

µm = Mikrometer, ml = Milliliter, MACS = *Magnetic Activated Cell Sorting*, cm² = Quadratzentimeter

2.7 Hardware

Tabelle 6 Hardware

Bezeichnung	Hersteller
Bench Microflow Biological Safety Cabinet	Astec-Microflow
BioFlux 200 Controller	Fluxion / IUL Biosystems GmbH
BioFlux 200 48 Well Interface	Fluxion / IUL Biosystems GmbH
BioFlux Vapor Trap	Fluxion / IUL Biosystems GmbH
FACSCanto™ Flow Cytometer	BD Biosciences
Gefrierschrank -20°C Premium NoFrost	Liebherr
Hereaus Multifuge X1	Thermo Fischer Scientific
Hereaus Multifuge X1R	Thermo Fischer Scientific
Inkubator	Forma Scientific
Kühlschrank Profil Line	Liebherr
Kamera QICAM 12-bit Mono Fast 1394 Cooled (Model: QIC-F-M-12-C)	Qimaging
Leica DM IL Lichtmikroskop	Leica Microsystems
MACS MultiStand	Miltenyi Biotech
OctoMACS Separator	Miltenyi Biotech
Pipet Boy	Integra
Pipetten	Eppendorf
Thermostatic Water Bath WBS 8	LabScientific
Neubauer Zählkammer	

FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*, °C = Grad Celcius, bit = *binary digit*, MACS = *Magnetic Activated Cell Sorting*

2.8 Software

Tabelle 7 Software

Name	Hersteller
BD FACSDiva Software	BD Biosciences
BioFlux 200 Software	Fluxion

FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*

3 Methoden

Die Methodik dieser Arbeit stützt sich auf folgende Punkte:

1. Zellkultur von humanen Mikroendothelzellen
2. Gewinnung von CD133+ KMSZ aus dem KM-Aspirat der Probanden/Probandinnen
3. Untersuchung der Adhäsion der CD133+ KMSZ unter Fluss an das Endothel im Co-Kulturmodell unter Verwendung des Bioflux 200 *Live Cell Imaging Systems*

Der verwendete Versuchsaufbau wurde zuvor in unserer Arbeitsgruppe etabliert.

Um ein tiefergehendes Verständnis über die Mechanismen der SZ-Adhäsion zu erlangen, wurden drei mögliche Schlüsselfaktoren des *Homings* von SZ in insgesamt sechs Versuchsreihen untersucht.

1. Thrombozyten
2. P-Selectin / PSGL-1
3. PECAM-1

Hierzu erfolgten entsprechende Vorinkubationen vor Perfusion des Endothels mit den CD133+ KMSZ. Die Anzahl der adhärenenten KMSZ wurde anschließend ausgewertet.

3.1 Zellkultur

Die HMEC-1 wurden bei 37 °C und 3 % CO₂ in 75 cm² großen Zellkulturflaschen kultiviert. Das Medium wurde zusätzlich mit 0,8 IE/ml Heparin versetzt. Ohne den Zusatz von Heparin hafteten die Zellen in den *Wells* der Versuchsplatten und strömten nicht in die Kanäle ein. Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen. Dafür wurde das Medium auf 37 °C erwärmt, das alte Medium abgenommen, die Zellen mit 3 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und 13 ml frisches Medium hinzugefügt.

Um die Zellen bei konfluentem Wachstum zu passagieren, wurden Medium, PBS und Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,05 % auf 37 °C erwärmt. Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen mit 3 ml PBS gespült. Dieses wurde wieder entnommen und 2 ml Trypsin auf die Zellen pipettiert. Die Zellen inkubierten für 3 - 5 Minuten (min) bei 37 °C bis zum Ablösen der Zellen. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen mit 5 ml PBS abgespült und in ein Falcon überführt. Das *Splitten* der Zellen erfolgte im Verhältnis von 3:1. Die Suspension wurde bis auf 30 ml mit PBS aufgefüllt und bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das

Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und wieder in eine 75 cm² Zellkulturflasche pipettiert. 13 ml Medium wurden hinzugefügt. Das Passagieren erfolgte unter sterilen Bedingungen.

Hinweis: Die ersten Versuche wurden mit einem Endothelzellmedium von PAA durchgeführt. Aufgrund von Lieferschwierigkeiten fand eine Umstellung auf das angegebene Medium von Pelobiotech statt.

3.2 Knochenmark-Punktion

Zur Gewinnung von CD133+ KMSZ wurde die *Spina iliaca anterior superior* unter sterilen Bedingungen im OP mit einer Standard Knochenmark-Punktionsnadel punktiert. Es wurden 80 ml Knochenmark aspiriert.

3.3 Aufbereitung des Knochenmarks

Die Aufbereitung erfolgte nach Protokoll der Firma Miltenyi und wurde bereits vorher in unserer Arbeitsgruppe angewandt.

3.3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen

Für die Aufbereitung des Knochenmarks wurde dieses im Verhältnis von 7:1 mit einem Puffer aus PBS und 2 mM EDTA verdünnt. Um Thromben zu entfernen, wurde das Knochenmark über einen 100 µm Filter filtriert.

15 ml Ficoll wurden in ein 50 ml Falcon vorgelegt und bis zu 35 ml des Knochenmarks vorsichtig darüber geschichtet. Bei mehr als 35 ml Knochenmark wurde dieses auf zwei oder mehr Falcons verteilt. Es erfolgte eine Zentrifugation zur Phasenbildung mit 445 g bei 20 °C für 35 min ohne Bremse.

Mithilfe einer sterilen Pasteurpipette wurde die entstandene trübe Interphase aus mononukleären Zellen entnommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Das Falcon mit der Interphase wurde mit PBS + 2 mM EDTA bis 50 ml aufgefüllt und bei 300 g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils verworfen.

Zur Lyse verbliebener Erythrozyten wurde das Pellet in 10 ml Ammoniumchloridlösung resuspendiert und für 5 min bei 4 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde aufgeschüttelt und für 10 min bei 300 g und 20 °C ohne Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 30 - 40 ml PBS + 2 mM EDTA gewaschen und erneut bei 300 g und 20 °C für 10 min, dieses Mal mit Bremse, zentrifugiert.

Das Pellet wurde mit 40 ml PBS + 2 mM EDTA resuspendiert und die Zellzahl Mithilfe einer Neubauerkammer bestimmt.

Hierzu wurden 10 µl Trypanblau und 10 µl der Zellsuspension vermischt und auf die Kammer aufgetragen. Zur Zellzahlberechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{gezählte } \emptyset \text{ Zellzahl (ZZ) * Verdünnungsfaktor 2 * 10.000 = ZZ/ml}$$

$$\text{Gesamtzellzahl} = \text{ZZ/ml} * X \text{ ml Puffer}$$

Die restliche Zellsuspension wurde für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Falcon direkt über Kopf gehalten und die Wände vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet.

3.3.2 Separation der CD133+ KMSZ

Mithilfe von *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) wurden die CD133+ KMSZ selektiert. Dazu wurde das Pellet in 300 µl MACS Puffer resuspendiert und zunächst mit 100 µl *fragment crystallizable receptor (FcR) Blocking Reagent* zur Blockade unspezifischer Rezeptoren versetzt. Anschließend wurden 100 µl CD133 *MicroBeads* zur magnetischen Markierung der CD133+ KMSZ hinzugefügt.

Die Zellsuspension wurde für 30 min im Kühlschrank bei 2 - 8 °C inkubiert. Zum Waschen wurden 1 - 2 ml MACS Puffer hinzugefügt und die Suspension bei 300 g für 10 min mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl MACS Puffer resuspendiert.

Die angegebenen Mengen gelten für eine Zellzahl bis zu 10^8 . Bei höheren Zellzahlen muss das Volumen angepasst werden.

Für die magnetische Trennung der Zellen wurde währenddessen eine *MS Column* mit den Flügeln nach vorne in den *OctoMACS Separator* (starker Magnet) eingesetzt und mit einem 30 µm *Pre-Separation Filter* bestückt, um Zellklumpen zurückzuhalten (Abb.1). Zur Vorbereitung wurden Filter und Säule mit 500 µl MACS Puffer angefeuchtet.

Die Zellsuspension wurde auf den Filter pipettiert. Sobald die Suspension vollständig durchgelaufen war, wurden 500 µl MACS Puffer zum Waschen aufgetragen. Der Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Durch die magnetische Markierung der CD133+ KMSZ wurden diese in der MACS Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen die Säule durchlaufen konnten.

Zur Elution der CD133+ KMSZ wurde der Filter entfernt, 1 ml MACS Puffer auf die Säule pipettiert, die Säule aus dem Magneten genommen und die Zellen mithilfe eines Stempels in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Hierbei sollte der Stempel zügig eingedrückt werden, um eine optimale Auslösung zu gewährleisten.

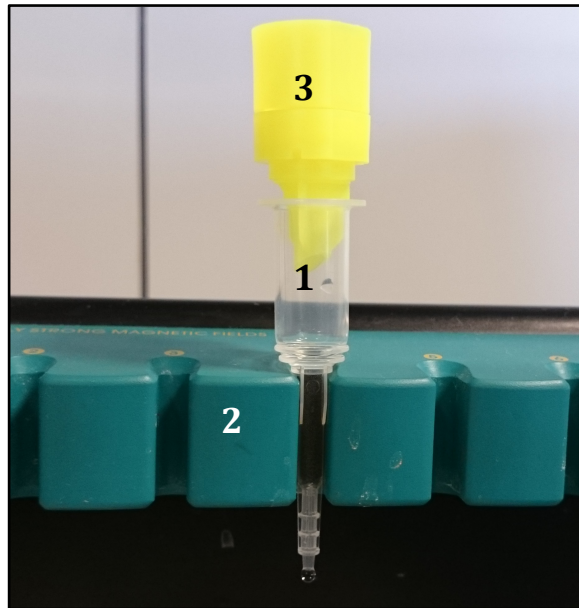


Abb. 1 MACS Vorrichtung zur Zellseparation

Die MS Column (1) wird in den OctoMACS Magneten (2) gesetzt. Der Pre-Separation Filter (3) hält Zellklumpen zurück. Die magnetisch markierten Zellen werden im schmalen Teil der Säule durch den Magneten zurückgehalten, MACS = Magnetic Activated Cell Sorting

Die folgende Zellzählung erfolgte mittels Neubauerkammer (s.o.).

3.4 Thrombozyten Gewinnung

Zur Gewinnung von Thrombozyten wurde den Patienten/-innen am Tag nach der KM-Aspiration Blut abgenommen. Die Abnahme erfolgte entweder aus der *Vena cubiti*, einem liegenden zentralen Venenkatheter (ZVK) oder einem liegenden arteriellen Zugang der *Arteria radialis*. Es wurden 2 Citratröhrchen entnommen.

Um *Platelet Rich Plasma* (PRP) zu erhalten, wurden die Blutproben bei Raumtemperatur mit 180 g für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der helle, thrombozytenhaltige Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette entnommen und bis zur Weiterverwendung bei Raumtemperatur in einem FACS-Röhrchen aufbewahrt.

Platelet Poor Plasma (PPP) wurde durch erneute Zentrifugation der Blutproben gewonnen. Diese erfolgte für 10 min bei 1000 g und einer Bremseinstellung von 9 bei Raumtemperatur. Der klare Überstand wurde ebenfalls mit einer Pasteurpipette entnommen und bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.5 Versuche unter Flussbedingungen mit Hilfe eines *Live Cell Imaging Systems* (BioFlux 200)

Bei dem BioFlux 200 System handelt es sich um ein *Live Cell Imaging System* der Firma Fluxion. Dabei wird mit Hilfe von Luftdruck ein laminarer Fluss innerhalb der Versuchskanäle erzeugt. Ferner ist es so möglich, physiologische Flussbedingungen in einem *in vitro* Modell zu erzeugen. Über ein angeschlossenes Lichtmikroskop (mit Kamera) war es möglich, die Versuche aufzunehmen.

Das BioFlux System ist in unserer Arbeitsgruppe eine bereits etablierte Methode. Die Versuchsabläufe wurden durch entsprechende Inkubationen der jeweiligen Fragestellung angepasst.

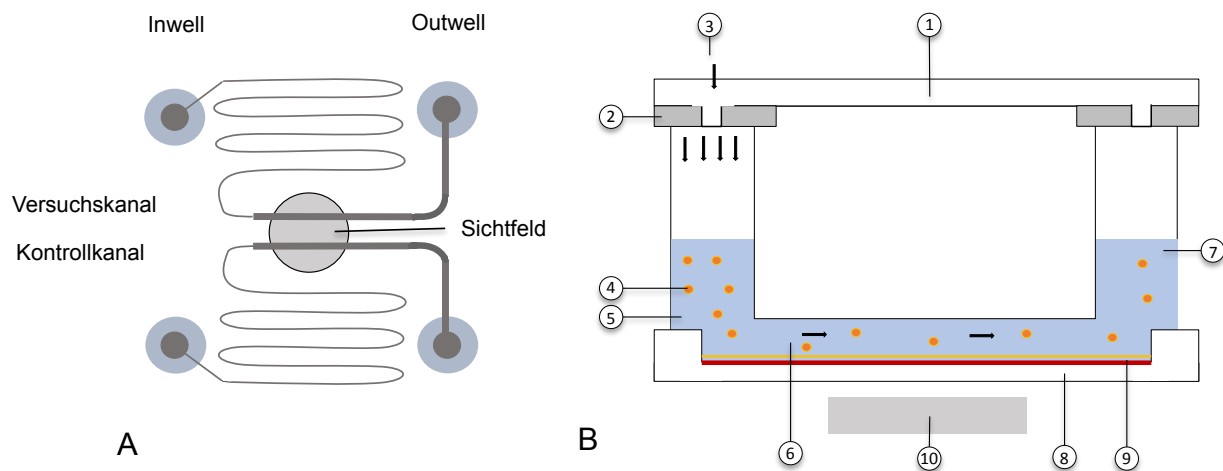


Abb. 2 Bioflux System. **A** Versuchseinheit. *In-* und *Out-Well* sind über einen Kanal miteinander verbunden. Pro Sichtfeld sind zwei Kanäle zu sehen, sodass Kontrolle und Versuch gleichzeitig zu beobachten sind. **B** Querschnitt durch Kanalsystem. Durch das aufgebrachte *Pressure Interface* (1) werden die *Wells* abgedichtet (2). Mittels Luftdruck (3) wird ein laminarer Fluss erzeugt, der die eingebrachten Zellen (4) vom *In-Well* (5) durch den Kanal (6) zum *Out-Well* (7) transportiert. Der Glasboden der Platte (8) kann z.B. mit einem Endothelmonolayer (9) ausgekleidet werden. Durch ein Mikroskop mit Kamera (10) kann der Kanal beobachtet/aufgenommen werden.

Für die Versuche wurden 48 - *Well* Platten verwendet, die für einen *shear stress* bis zu 20 dyne/cm² ausgelegt sind. Zu einem Versuch gehörten zwei Kanäle, die je ein *In-Well* und ein *Out-Well* miteinander verbanden. Das Sichtfeld unter dem Mikroskop erfasste beide Kanäle (Abb. 2A). Dadurch war es möglich, Versuche mit Test- und Kontrollsubstanz parallel durchzuführen und aufzuzeichnen. Die Kanäle wurden mit einer Schutzfolie überklebt. Die Folie wurde über den *Wells*, die für den jeweiligen Versuch verwendet wurden, kreuzförmig eingeritzt. Über diese Schlitze konnten die gewünschten

Substanzen eingebracht werden und das dann aufgeschraubte *pressure interface* durch Luftdruck den gewünschten Fluss in den Kanälen erzeugen (Abb. 2B). Die Höhe des *shear stress* wurde mithilfe der BioFlux 200 Software reguliert.

3.5.1 Einbringen der Endothelzellen in die Versuchsplatten

Um Lebersinusoide zu imitieren, wurden die Versuchskanäle mit den HMEC-1 ausgekleidet. Damit die Endothelzellen in den Mikrokanälen haften konnten, wurden diese zunächst mit Fibronektin beschichtet. Fibronektin wurde in 70 µl Aliquots mit einer Konzentration von 1 mg/ml bei -20 °C gelagert. Pro Versuch wurde ein Aliquot aufgetaut und mit 200 µl destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 200 µg/ml verdünnt. Je 100 µl Fibronektin (200 µg/ml) wurden in das *Out-Well* von Probe- und Versuchskanal pipettiert. Die Platte wurde an das Bioflux-System angeschlossen. Bei 5 dyne/cm² wurden die Kanäle von *Out* nach *In* ca. 1 Minute lang gespült, bis in den *In-Wells* ein Tropfen Fibronektin zu sehen war. Danach inkubierte der Kanal für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Das Endothelzellmedium wurde auf 37 °C erwärmt. Nach der Inkubationszeit wurden je 500 µl Endothelzellmedium in die *Out-Wells* pipettiert und die Kanäle 15 min von *Out* nach *In* bei 5 dyne/cm² gespült. Das übrige Medium wurde entfernt. Ein Rest von ca. 1 µl blieb zurück.

Die HMEC-1 wurden, wie oben (Abschnitt 3.1) beschrieben, aus den Kulturflaschen gelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl des Zellkulturmediums resuspendiert.

Es wurden je 100 µl der HMEC-1 Lösung in die *Out-Wells* und je 100 µl des Endothelzellmediums mit Wachstumsfaktoren in die *In-Wells* pipettiert. Pro Kanal wurden in der Regel $1,5 \times 10^6$ Zellen verwendet.

Unter mikroskopischer Kontrolle wurden bei 0,2 dyne/cm² die Endothelzellen mit Hilfe des Bioflux-Systems in die Kanäle eingebracht. Der Fluss wurde für ca. 4 Sekunden von *Out* nach *In* erzeugt, bis Zellen an das Ende des Kanals gelangten. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Zellen gleichmäßig die Kanäle bedeckten (Abb. 3A). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wurden je 500 µl Endothelzellmedium mit Wachstumsfaktoren in *Out*- und *In-Wells* pipettiert.

Um möglichst konfluent bewachsene Kanäle zu erhalten, wurden die Kanäle bis zum nächsten Tag bei 37 °C inkubiert (Abb. 3B).

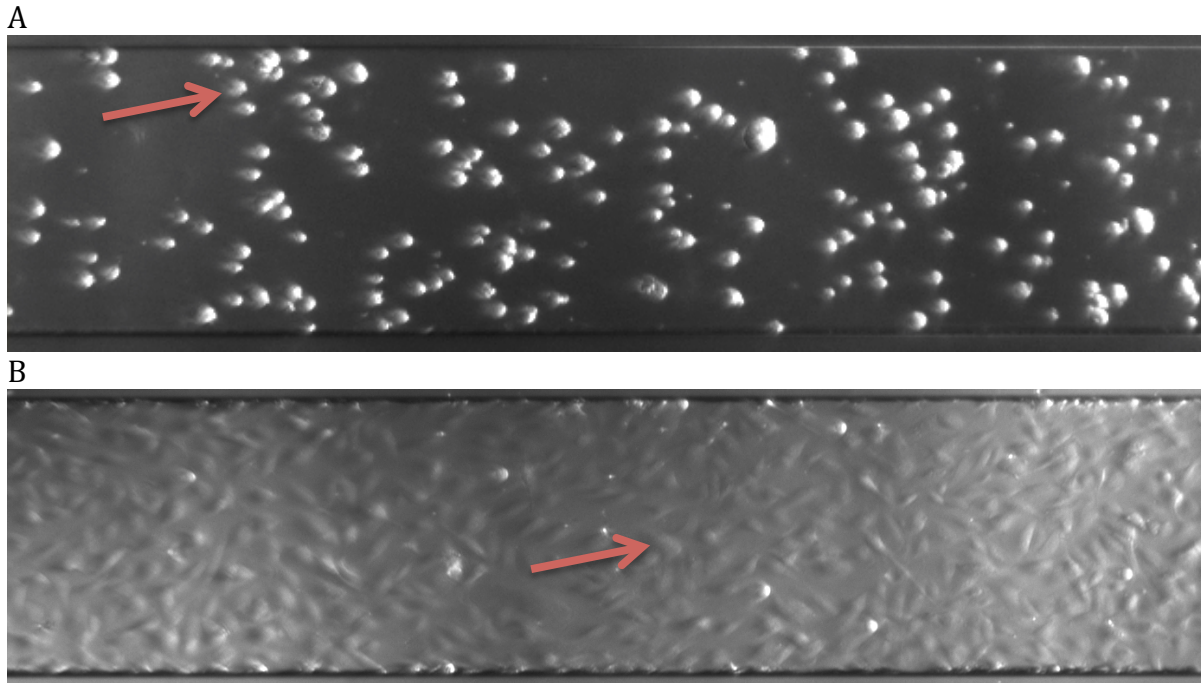


Abb. 3 Versuchskanäle, 20 fache Vergrößerung. A: Kanal direkt nach Einziehen der HMEC-1. B: konfluentes Wachstum im Kanal nach Inkubation bei 37 °C über Nacht. Pfeile markieren beispielhaft HMEC-1 Zellen. HMEC-1 = *Human Microvaskular Endothelial Cells 1*, °C = Grad Celsius

3.5.2 Versuchsaufbau

Die am Vortag vorbereiteten Kanäle wurden mit 5 dyne/cm² für 5 Minuten von *In* nach *Out* gespült. Das Medium wurde aus allen *Wells* abgenommen.

Für die Untersuchung des Einfluss der Thrombozyten auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ (Vorversuche) wurden 100 µl PPP in das obere *In-Well* (Kontrollkanal) und 100 µl PRP in das untere *In-Well* (Probenkanal) pipettiert. Die *Out-Wells* wurden mit je 100 µl Endothelzellmedium befüllt.

Für die übrigen Versuche wurde PRP sowohl für den Kontroll- als auch für den Probenkanal verwendet.

Die mit Endothelzellen ausgekleideten Kanäle wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 dyne/cm² für ca. 1 min von *In* nach *Out* mit den Thrombozyten perfundiert und anschließend für 15 min ohne Fluss bei 37 °C inkubiert.

Die *In-Wells* wurden geleert, mit 500 µl Medium befüllt und die Kanäle bei 5 dyne/cm² für 15 min von *In* nach *Out* gespült.

Die Zellsuspension der CD133+ KMSZ wurde bei 300 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet in 200 µl Medium resuspendiert. Die Stammzellzahl pro Kanal sollte jeweils 10^5 Zellen betragen.

Alle *Wells* wurden geleert. Anschließend wurden die *Out-Wells* mit je 100 µl Medium und die *In-Wells* mit je 100 µl Stammzellsuspension befüllt.

Um den Versuch aufzuzeichnen, wurde ein Abschnitt gewählt, auf dem beide Kanäle möglichst gleich konfluent mit Endothelzellen ausgekleidet waren. Die Helligkeit und der Kontrast wurden im *Live-Modus* angepasst. Die Flussgeschwindigkeit wurde auf 1 dyne/cm² eingestellt, die Laufzeit auf 1 Stunde und die Bildaufnahme auf 1 Bild / 6s. Der Fluss lief von *In* nach *Out*.

Abbildung 4 zeigt eine schematische Übersicht der einzelnen, nachfolgend im Detail beschriebenen Versuchsbedingungen und Vorinkubationen.

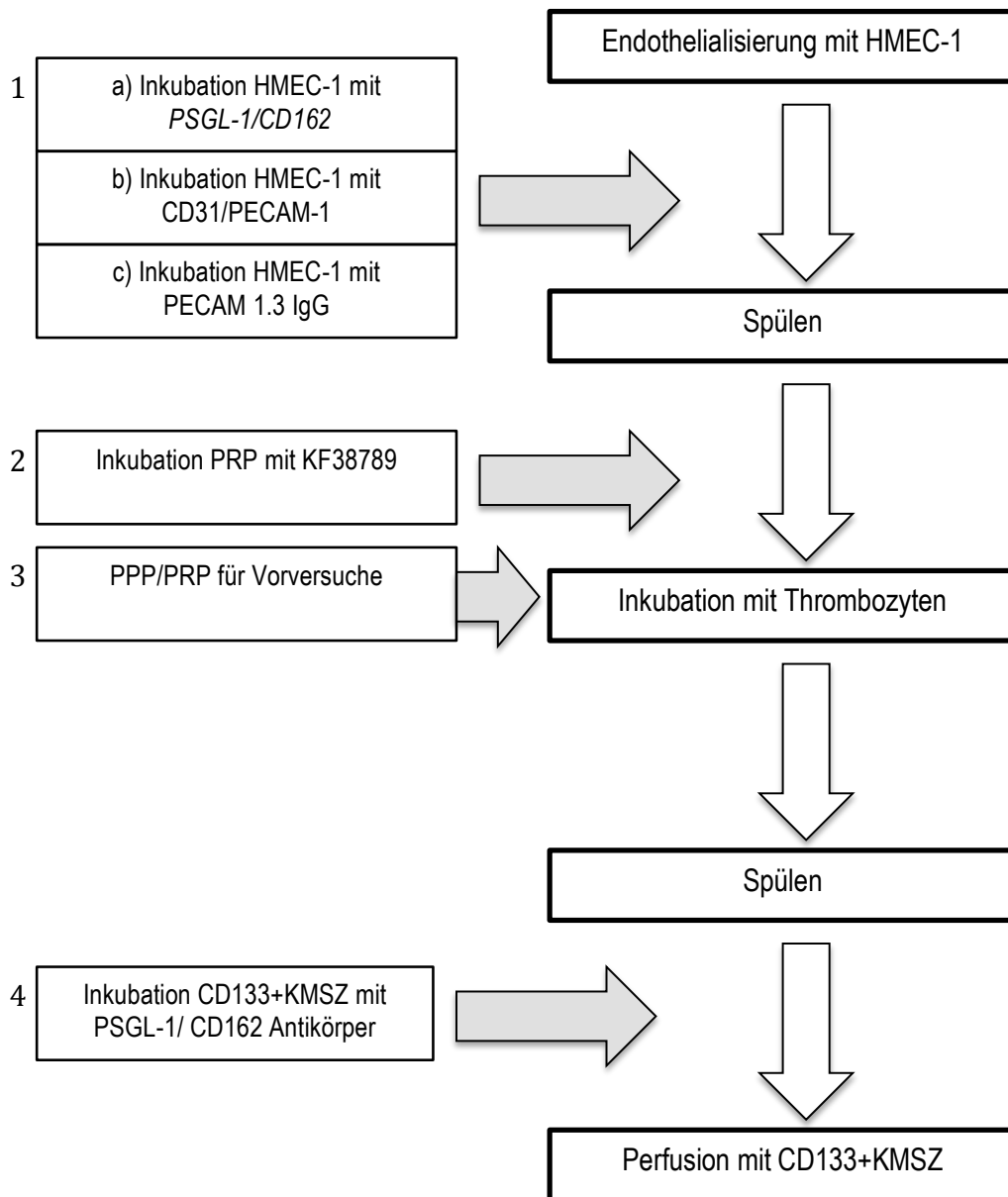


Abb. 4 Schematischer Ablauf der Versuche und der verschiedenen Vorinkubationen Rechte Säule zeigt den Grundaufbau der Versuche im Mikrofluidik-System (Bioflux 200), links zusätzliche Inkubationen nach zeitlichem Hinzufügen sortiert. [1] a-c HMEC-1 werden zusätzlich inkubiert. [2] PRP wird vor Einbringen in die Kanäle inkubiert. [3] Thrombozyten werden eingebracht. Für die erste Versuchsreihe wird hier PPP als Kontrolle und PRP als Probe verwendet. [4] KMSZ werden vor Einbringen in die Kanäle inkubiert. HMEC-1 = *Human Microvaskular Endothelial Cells 1*, PSGL-1 = *P-Selectin Glykoprotein Ligand -1*, CD = *Cluster of differentiation*, PECAM-1 = *Platelet endothelial cell adhesion molecule -1*, IgG = *Immunglobulin G*, PRP = *Platelet rich plasma*, KF38789 = *P-Selectin Inhibitor*, PPP = *Platelet poor plasma*, KMSZ = *Knochenmarkstammzellen*

3.5.2.1 Einfluss der P-Selectin/PSGL-1-Achse auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ

Um den Einfluss von P-Selectin und seinem Liganden PSGL-1 zu untersuchen, wurden drei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt.

3.5.2.1.1 PSGL-1 – Vorinkubation der HMEC-1

Das hierfür verwendete *Recombinant Human PSGL-1/CD162* wurde in 12 µl Aliquots bei -70 °C gelagert und in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Für den Probekanal wurde ein Aliquot aufgetaut und mit 108 µl Medium versetzt. Für den Kontrollkanal wurden 108 µl des Mediums mit 12 µl PBS versetzt. Nach dem ersten Spülgang wurden die *Wells* geleert, je 100 µl Medium in die *Out-Wells* pipettiert und 100 µl der vorbereiteten Lösungen in die *In-Wells* des Probe- bzw. Kontrollkanals gegeben. Die Endothelzellen des Probekanal wurden bei einem Fluss von 0,2 dyne/cm² von *In* nach *Out* für 30 min mit PSGL-1 inkubiert (vgl. Abb 4.1a). Die *Wells* wurden geleert und mit je 500 µl Medium befüllt. Es erfolgte ein weiterer Spülgang für 5 min bei 5 dyne/cm². Der weitere Ablauf erfolgte analog der o.g. Beschreibung (vgl. 3.5.2).

3.5.2.1.2 KF38789 – Vorinkubation der Thrombozyten

Der P-Selectin *Inhibitor* KF38789 wurde in einer Konzentration von 10 µM (gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO)) verwendet und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Vor der Inkubation der Endothelzellen mit PRP wurden die Thrombozyten vorbehandelt (vgl. Abb 4.2). Für den Probekanal wurden 1,2 µl KF38789 (1:100 Verdünnung mit DMSO) zu 118,8 µl des vorbereiteten PRPs pipettiert. Für den Kontrollkanal wurden 1,2 µl DMSO zu 118,8 µl PRP gegeben. Die Thrombozyten inkubierten für 20 min bei Raumtemperatur. Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 3.5.2).

3.5.2.1.3 PSGL-1 Antikörper – Vorinkubation der CD133+ KMSZ

Der PSGL-1/ CD162 Antikörper wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet und in Aliquots bei 2 - 8 °C im Kühlschrank gelagert. Bei dieser Versuchsreihe wurden die CD133+ KMSZ vorinkubiert (vgl. Abb 4.4). Die selektierten Zellen wurden auf zwei Aliquots à 10⁵ Zellen aufgeteilt und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Für den Probekanal wurden 6 µl der CD162-Antikörper Stocklösung zu 114 µl Medium gegeben. Ein Stammzellpellet wurde in 100 µl dieser Lösung resuspendiert. Das andere Pellet wurde in 100 µl einer Lösung aus 114 µl Medium und 6 µl destillierten Wassers resuspendiert. Die Stammzellen inkubierten 10 min bei 37 °C. Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 3.5.2).

3.5.2.2 Einfluss von PECAM-1 / CD31

Um den Einfluss von PECAM-1 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Versuchsansätze durchgeführt.

3.5.2.2.1 PECAM 1.3 IgG – Vorinkubation der HMEC-1

PECAM 1.3 IgG wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet und in Aliquots bei 4 °C gelagert. Für den Probekanal wurde eine Lösung aus 114,5 µl Medium und 5,45 µl PECAM 1.3 IgG in einer 1:10 Verdünnung mit destilliertem Wasser vorbereitet. Für den Kontrollkanal bestand die Lösung aus 114,5 µl Medium und 5,45 µl destilliertem Wasser. Nach dem ersten Spülgang wurden die *Wells* geleert, die *Out-Wells* mit je 100 µl Medium befüllt und die *In-Wells* mit 100 µl der entsprechend vorbereiteten Lösung (vgl. Abb 4.1c). Die Kanäle wurden 1 min bei 1 dyne/cm² mit den Lösungen perfundiert und inkubierten ohne Fluss bei 37 °C für 20 min. Alle *Wells* wurden geleert, mit 500 µl Medium befüllt und die Kanäle 5 min bei 5 dyne/cm² von *In* nach *Out* gespült. Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 3.5.2).

3.5.2.2.2 CD31/PECAM-1 – Vorinkubation der HMEC-1

Recombinant Human CD31/PECAM-1 wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet und in Aliquots bei -20 °C gelagert. Nach dem ersten Spülgang wurden die *Wells* geleert und in das *In-Well* des Probekanals 100 µl einer Lösung aus 112 µl Medium und 8 µl CD31-Stocklösung pipettiert. In das *In-Well* des Kontrollkanal wurden 100 µl einer Lösung aus 112 µl Medium und 8 µl destillierten Wassers gegeben. In die *Out-Wells* wurden je 100 µl Medium pipettiert. Die Endothelzellen wurden bei 1 dyne/cm² für ca. 1 min mit den Lösungen von *In* nach *Out* perfundiert und inkubierten dann für 30 min ohne Fluss bei Raumtemperatur (vgl. Abb 4.1b). Alle *Wells* wurden geleert, mit 500 µl Medium befüllt und die Kanäle 5 min bei 5 dyne/cm² von *In* nach *Out* gespült. Der weitere Ablauf erfolgte wie oben beschrieben (vgl. 3.5.2).

3.6 Auswertung

Um die Anzahl adhärenter Stammzellen zu ermitteln, wurden die CD133+ KMSZ anhand von Kameraaufnahmen ausgezählt. Dazu wurde eine Kameraaufnahme der Kanäle vor Inkubation und eine Aufnahme nach einer Stunde Inkubation mit den CD133+ KMSZ unter Flussbedingungen ausgewählt. Die Aufnahmen der Kontrollkanäle und die Aufnahmen der Probekanäle wurden auf PowerPoint - Folien zusammengefügt und verglichen. Adhärente KMSZ wurden markiert und gezählt (Abb. 5).

Stichprobenartige Zweitauszählungen dienten als Kontrolle.

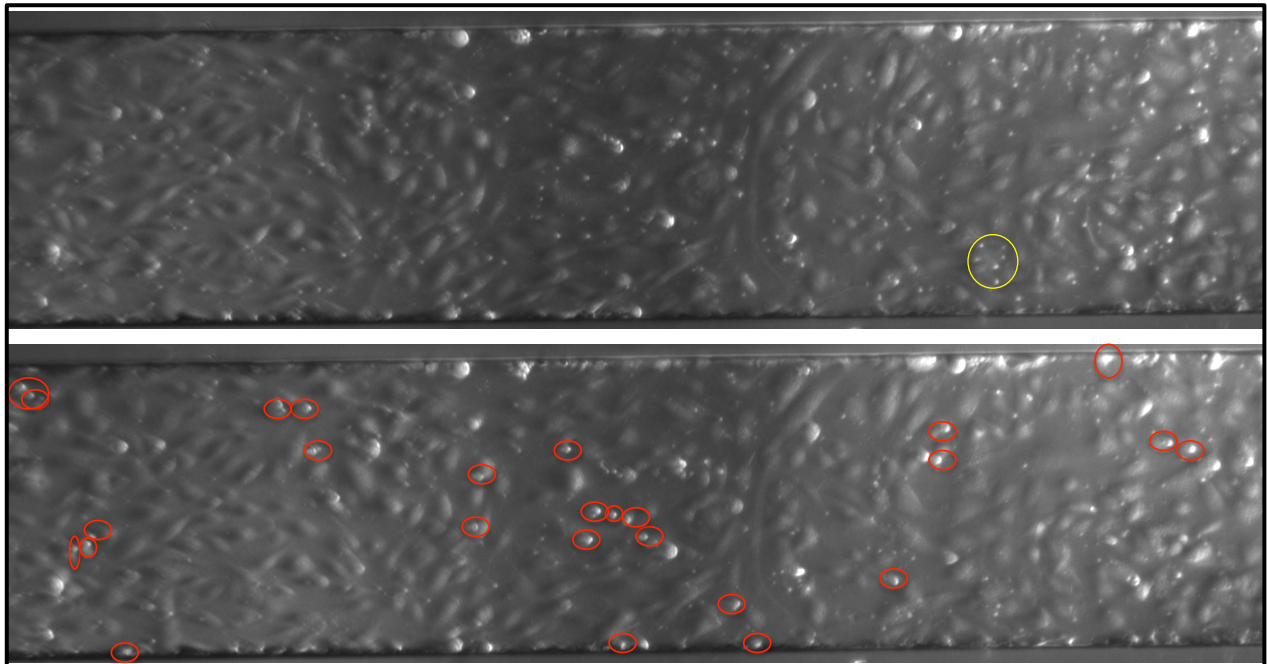


Abb. 5 Beispielhafte Versuchsauswertung, 20 fache Vergrößerung. Oberer Kanal: konfluent mit HMEC-1 ausgekleidet und mit Thrombozyten inkubiert. Unterer Kanal: nach 1h Perfusion mit CD133+ KMSZ. Markierungen im unteren Kanal (rot) zeigen adhärenente CD133+ KMSZ. Markierung im oberen Kanal (gelb) zeigt beispielhaft Gruppe von Thrombozyten. HMEC-1 = *Human Microvascular Endothelial Cells*, KMSZ = Knochenmarkstammzellen, h = Stunde

3.7 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Bei ausreichender Anzahl mittels *Magnetic Cell Sorting* nach MACS isolierter CD133+ KMSZ wurden *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS) Analysen angefertigt. Dies diente zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Zellen und damit der Qualitätssicherung.

3.7.1 Grundprinzip

Bei der Durchflusszytometrie können Zelleigenschaften durch Messung von Streulicht und Fluoreszenzen bestimmt werden. Hierbei fließen die Zellen durch einen Hüllstrom in Einzelzellsuspension durch eine Messkammer. Innerhalb dieser kreuzen sie einen im rechten Winkel angeordneten Laser, wodurch Streulicht erzeugt wird. Man unterscheidet Vorwärtstreulicht (engl. *Forward Scatter*, FSC) von Seitwärtstreulicht (engl. *Side Scatter*, SSC). Beim FSC wird Streulicht in einem flachen Winkel gemessen und gibt Hinweise auf die Zellgröße. Der SSC wird im rechten Winkel zum Laser gemessen und ist abhängig von der Granularität der Zelle. Zur weiteren Identifikation der Zellen ist es möglich, fluoreszenzmarkierte Antikörper einzusetzen. Diese binden spezifisch an

intrazelluläre- sowie Oberflächen-Antigene und erlauben dadurch eine selektive Zellanalyse. Die Absorptionsspektren der gekoppelten Fluorophore werden durch den Laser angeregt und durch weitere aufsteigend benannte Detektoren (FL1, FL2, etc.) ebenfalls im 90° Winkel erfasst. Die verschiedenen Emissionsspektren werden durch Farbteilerspigel getrennt, mit Hilfe von Photomultipliern aufgenommen und umgewandelt. Dieses Verfahren ermöglicht eine quantitative und molekulare Analyse der Zellen (Rothe, 2007).

3.7.2 Cellsorting

Demselben Prinzip folgt das *Cellsorting*, hierbei erfolgt jedoch eine zusätzliche Subfraktionierung. Im Laufe der Analyse erhält die Einzelzellsuspension eine positive oder negative elektrische Ladung. Eine der Flusskammer nachgeschaltete Stromquelle erzeugt ein Spannungsfeld, durch welches die Zellen entsprechend ihrer Ladung getrennt werden. Dies ermöglicht eine Aufteilung in mehrere Populationen. Der nicht zuzuordnende Überschuss wird verworfen (Ibrahim and van den Engh, 2007).

3.7.3 FACS-Färbung

In Vorbereitung auf die FACS-Analyse wurde die Zellsuspension bei 300 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 100 µl PBS pro Färbung resuspendiert (300 µl für 3 Färbungen). Pro Färbung wurden je 100 µl der Zellsuspension in ein FACS Röhrchen pipettiert und die jeweiligen Antikörper hinzugegeben. Pro Färbung sollten 10⁵ Zellen verwendet werden.

1. Färbung:
 - a. 2 µl PE-CyTM7 Mouse Anti-Human CD45
 - b. 10 µl CD133/2 (293C3)-PE human
 - c. 2 µl anti-CD39/FITC
 - d. 5 µl CD34 APC (8G12)
2. Isotyp Färbung
 - a. 2 µl PE-CyTM7 Mouse IgG1 κ Isotype Control
 - b. 10µl Mouse IgG2b-PE
 - c. 2 µl FITC Mouse IgG1 κ Isotype Control
 - d. 5 µl APC Mouse IgG1 κ Isotype Control
3. Kontrolle – ungefärbt (Negativkontrolle)

Die Suspensionen wurden gründlich mit dem Vortexer gemischt und 10 min im Dunkeln bei 2 – 8 °C inkubiert. Zu jeder Probe wurden 2 ml PBS hinzugefügt. Die Zellen wurden

10 min bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Pellets in je 250 µl PBS resuspendiert. Hierdurch wurden überschüssige Antikörper entfernt und dadurch störende Hintergrundsignale reduziert. Anschließend wurden die Proben gevortext und mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert.

3.8 Statistische Auswertung

Für die in Kapitel 4 dargestellten Versuchsergebnisse wurde die statistische Datenanalyse sowie die graphischen Darstellungen mit Microsoft Excel für Mac (Version 16.16.9) generiert. Die Mittelwerte wurden mittels gepaartem t-Test verglichen. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Standardabweichung (SD) gibt die Abweichungen vom Mittelwert an.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung Patientenkollektiv

4.1.1 Allgemeine Daten

Von den teilnehmenden Personen waren 53,33% (n=16) männlich und 46,67% (n=14) weiblich. 90 % (n=27) der zugrundeliegenden Erkrankungen waren maligne, 10 % (n=3) benigne. Benigne Grunderkrankungen traten lediglich in der männliche Kohorte auf. Das Pancraskarzinom war der häufigste Grund für eine Operation (29,99 %). In 19,99 % (n=6) der malignen Erkrankungen lag eine hepatische Metastasierung vor (Tabelle 1).

4.1.2 Laborparameter

Bei allen Knochenmarkspendern wurden prä- und postoperative Laborparameter dokumentiert.

Im Blutbild zeigten sich ein postoperativer Abfall des Hämoglobins (Hb) und der Thrombozyten sowie ein leichter Anstieg der Leukozyten (Tabelle 8).

Tabelle 8 Durchschnittliche Werte ($\pm$ SD) von Hb, Leukozyten und Thrombozyten prä- und postoperativ

Blutbild		
Hb [g/dl]	prä-OP	12,74 $\pm$ 1,9
	post-OP	10,35 $\pm$ 1,35
Leukozyten [Tsd./ μ l]	prä-OP	7,33 $\pm$ 2,76
	post-OP	9,72 $\pm$ 2,76
Thrombozyten [Tsd./ μ l]	prä-OP	255,9 $\pm$ 99,09
	post-OP	185,43 $\pm$ 78,4

SD = Standardabweichung, Hb = Hämoglobin, g = Gramm, dl = Deziliter, OP = operativ, Tsd. = Tausend, μ l = Mikroliter

Die Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff sowie die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) blieben konstant. Bei einem Knochenmarkspender wurde die GFR prä- und postoperativ nicht berechnet (Tabelle 9).

Tabelle 9 Durchschnittliche Werte ($\pm$ SD) von Kreatinin, GFR und Harnstoff prä- und postoperativ

Retentionsparameter		
Kreatinin [mg/dl]	prä-OP	0,82 $\pm$ 0,24
	post-OP	0,83 $\pm$ 0,28
GFR [ml/min]	prä-OP	88,83 $\pm$ 20,79
	post-OP	91,31 $\pm$ 31,02
Harnstoff [mg/dl]	prä-OP	31,8 $\pm$ 12,24
	post-OP	30,83 $\pm$ 11,43

SD = Standardabweichung, GFR = glomeruläre Filtrationsrate, mg = Milligramm, dl = Deziliter, OP = operativ, min = Minute

Die Transaminasen Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zeigten im Durchschnitt einen deutlichen postoperativen Anstieg. Präoperativ wurden bei zwei Patienten/-innen keine Transaminasen bestimmt. Postoperativ lagen für vier Patienten/-innen keine GOT-Werte sowie für 11 Patienten/-innen keine GPT-Werte vor. Das Bilirubin zeigte einen milden postoperativen Anstieg. Hierbei lag bei drei Patienten/-innen kein präoperativer und bei neun Patienten/-innen kein postoperativer Wert vor (Tabelle 10).

Tabelle 10 Durchschnittliche Werte ($\pm$ SD) von GOT, GPT und Bilirubin prä- und postoperativ

Leberwerte		
GOT [U/l]	prä-OP	51,57 $\pm$ 62,36
	post-OP	205,81 $\pm$ 276,9
GPT [U/l]	prä-OP	60,11 $\pm$ 77,83
	post-OP	155,74 $\pm$ 171,66
Bilirubin [mg/dl]	prä-OP	2,51 $\pm$ 5,33
	post-OP	2,89 $\pm$ 4,17

SD = Standardabweichung, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, U/l = Units pro Liter, OP = operativ, mg = Milligramm, dl = Deziliter

Postoperativ zeigte sich durchschnittlich ein Abfall des Quick-Wertes und ein dementsprechender Anstieg der *International Normalized Ratio* (INR). Prä- und postoperativ lagen bei je drei Patienten/-innen diese Gerinnungswerte nicht vor (Tabelle 11).

Tabelle 11 Durchschnittliche Werte ($\pm$ SD) von Quick und INR prä- und postoperativ

Gerinnung		
Quick [%]	prä-OP	97 $\pm$ 13,07
	post-OP	72,44 $\pm$ 12,74
INR	prä-OP	1,02 $\pm$ 0,1
	post-OP	1,23 $\pm$ 0,16

SD = Standardabweichung, % = Prozent, INR = *International Normalized Ratio*, OP = operativ

4.2 FACS-Analyse

Die Ausbeute an CD133+ KMSZ (nach Aufbereitung des KM) wurde mittels FACS-Analysen bestimmt, sofern eine ausreichende Anzahl an Zellen gewonnen werden konnte. Bei 23,33 % (n=7) der Proben konnten nicht ausreichend Zellen für eine FACS-Analyse isoliert werden. Bei 20 % (n=6) erfolgten lediglich die Färbungen, jedoch keine ungefärbte Kontrolle.

Die durchschnittliche Ausbeute an CD133+ KMSZ betrug 53,32 % ($\pm$ 21,6 %) Die maximale Ausbeute betrug 87 %, die minimale Ausbeute lag bei 13 %. Markiert wurden die Oberflächenmarker CD45, CD133, CD39 und CD34.

Die Abbildungen 6 - 8 zeigen eine exemplarische FACS-Analyse. Zunächst wurden FSC und SSC gegeneinander aufgetragen. Das *Gate* P1 markiert hierbei die Lymphozytenpopulation mit einem Anteil von 23,9 % (Abb. 6A). Diese wurde durch die Antikörper-Färbung weiter klassifiziert. CD133+ und CD45+ Zellen werden in *Gate* P2 (56,3 %) erfasst und nur CD45+ Zellen in *Gate* P3 (39,8 %) (Abb. 6B). Abbildung 6C zeigt CD133+ und CD34+ Zellen.

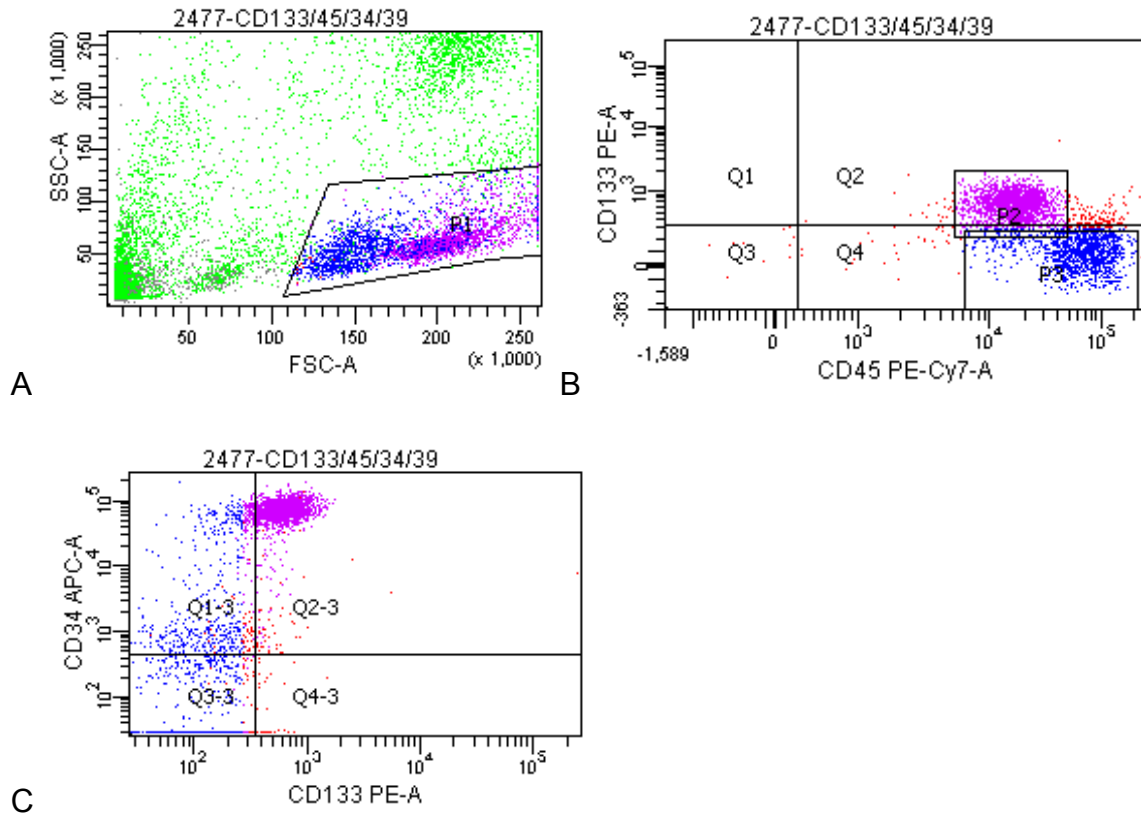


Abb. 6 Exemplarische FACS-Analyse gefärbte Probe. Dot Plots einer gefärbten Zellpopulation. A) FSC ist gegen SSC aufgetragen. P1 zeigt die Lymphozytenpopulation. B) CD45 ist gegen CD133 aufgetragen. P2 markiert Zellen die beide Oberflächenmarker tragen, P3 markiert CD45+ Zellen. C) CD133 ist gegen CD34 aufgetragen. In Violett ist eine Population mit beiden Markern dargestellt. FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FSC = *Forward Scatter*, SSC = *Side Scatter*, CD = *Cluster of differentiation*

Die Isotyp-Kontrolle (Abb. 7) zeigt eine unspezifische Reaktion für alle Oberflächenmarker.

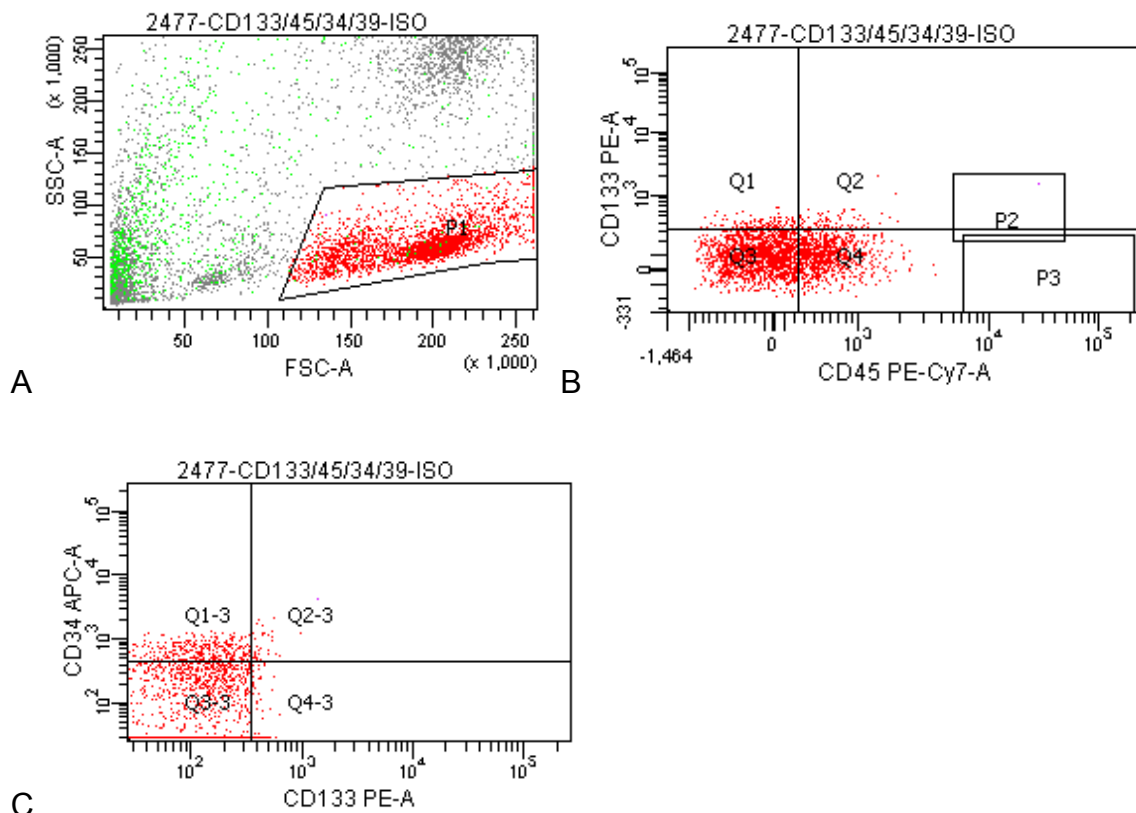


Abb. 7 Exemplarische FACS-Analyse Isotyp-Kontrolle. Dot Plots einer Isotyp-gefärbten Zellpopulation. A) FSC ist gegen SSC aufgetragen. P1 zeigt die Lymphozytenpopulation. B) CD45 ist gegen CD133 aufgetragen. Die Gates P2 und P3 zeigen keine für die Oberflächenantigene positiven Zellen C) CD133 ist gegen CD34 aufgetragen. Kein Nachweis positiver Zellen. FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting, FSC = Forward Scatter, SSC = Side Scatter, CD = Cluster of differentiation

In der ungefärbten Probe (Abb. 8) konnten erwartungsgemäß keine Oberflächenmarker nachgewiesen werden.

Die untersuchte Zellpopulation wies die Oberflächenmarker CD133, CD45 und CD34 auf. Die Subpopulation der CD133/CD45 positiven Zellen hatte einen Anteil von 56,3 %. Die gewonnen Zellen waren für die durchgeführten Versuche geeignet.

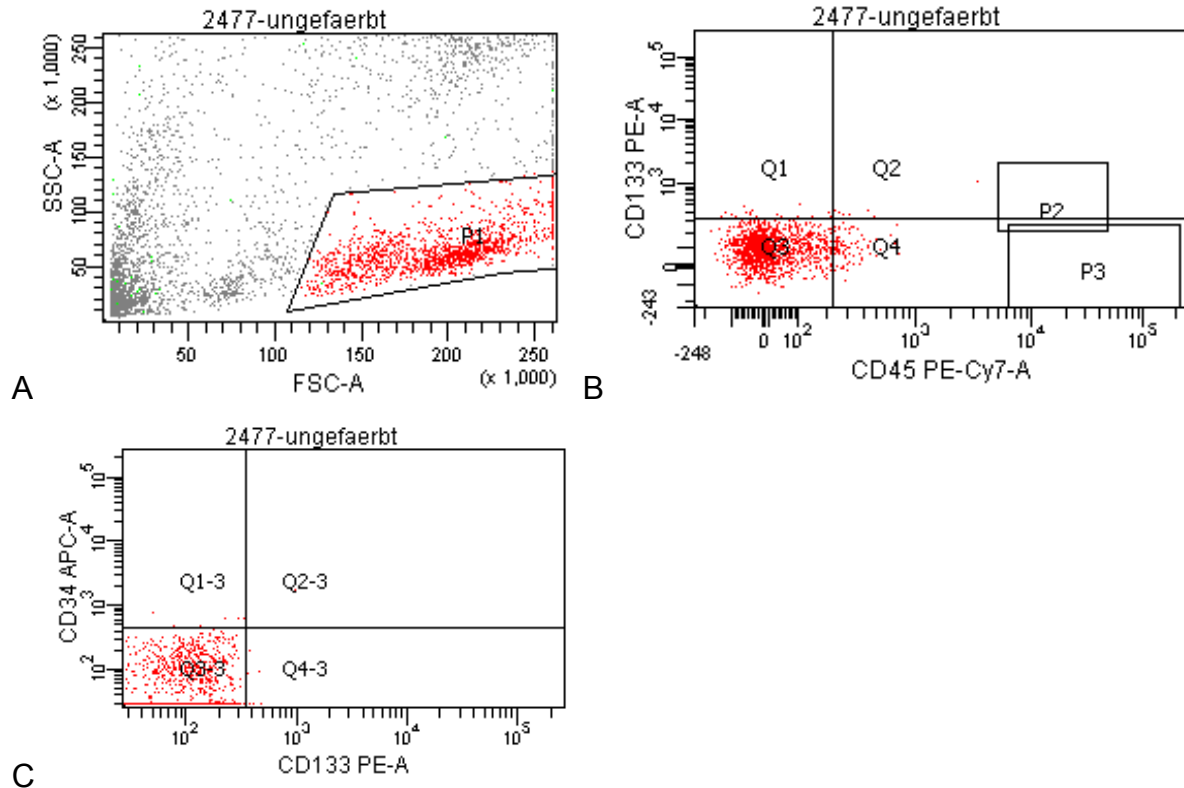


Abb. 8 Exemplarische FACS-Analyse ungefärbte Probe. Dot Plots einer ungefärbten Zellpopulation. A) FSC ist gegen SSC aufgetragen. P1 zeigt die Lymphozytenpopulation. B) CD45 ist gegen CD133 aufgetragen. Kein Nachweis positiver Zellen. C) CD133 ist gegen CD34 aufgetragen. Kein Nachweis positiver Zellen. FACS = *Fluorescence Activated Cell Sorting*, FSC = *Forward Scatter*, SSC = *Side Scatter*, CD = *Cluster of differentiation*

4.3 Versuche unter Flussbedingungen im *Mikrofluidic*-System (Bioflux200)

Zur Auswertung der Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ wurde jeweils eine Aufnahme des Kontroll- und des Probekanals vor Beginn der Perfusion und nach einer Stunde Perfusion mit CD133+ KMSZ gewählt, die adhärenen KMSZ gezählt (vgl. Abb. 5) und beide Kanäle anschließend verglichen. Die Auswertung erfolgte manuell.

4.3.1 Einfluss der Co-Inkubation mit thrombozytenreichem Plasma (PRP) im Vergleich zu thrombozytenarmen Plasma (PPP) auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

Als Grundlage wurde die Anheftung der CD133+ KMSZ in Abhängigkeit von Thrombozyten untersucht (n=5). Hierzu erfolgte die Inkubation der endothelialisierten Versuchskanäle mit PRP einerseits und mit PPP andererseits.

Nach Inkubation des Endothelmonolayers mit PRP waren durchschnittlich 45,4 CD133+ KMSZ adhärenent. Nach Inkubation des Endothels mit PPP waren durchschnittlich 3,6 CD133+ KMSZ adhärenent (Tabelle 12).

Tabelle 12 Einzelergebnisse der Versuche (I-V) zum Einfluss von PRP vs. PPP auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	SD
PRP	6	5	20	47	149	45,4	60,3431852
PPP	0	4	11	1	2	3,6	4,393176527

PRP = *Platelet Rich Plasma*, PPP = *Platelet Poor Plasma*, CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, SD = Standardabweichung

Somit ergibt sich im Durchschnitt die 12,6-fache Anzahl adhärenenter CD133+ KMSZ bei Co-Inkubation mit PRP im Vergleich zu PPP (Abb. 9). In allen Versuchen war die Anzahl der adhärenenten Zellen nach Co-Inkubation mit Thrombozyten-angereichertem PRP im Vergleich zu Thrombozyten-freiem PPP gesteigert. Jedoch liegt, unter Verwendung des gepaarten t-Tests, in der hier durchgeführten Zahl der Versuche kein signifikantes Ergebnis vor ($p=.101$).

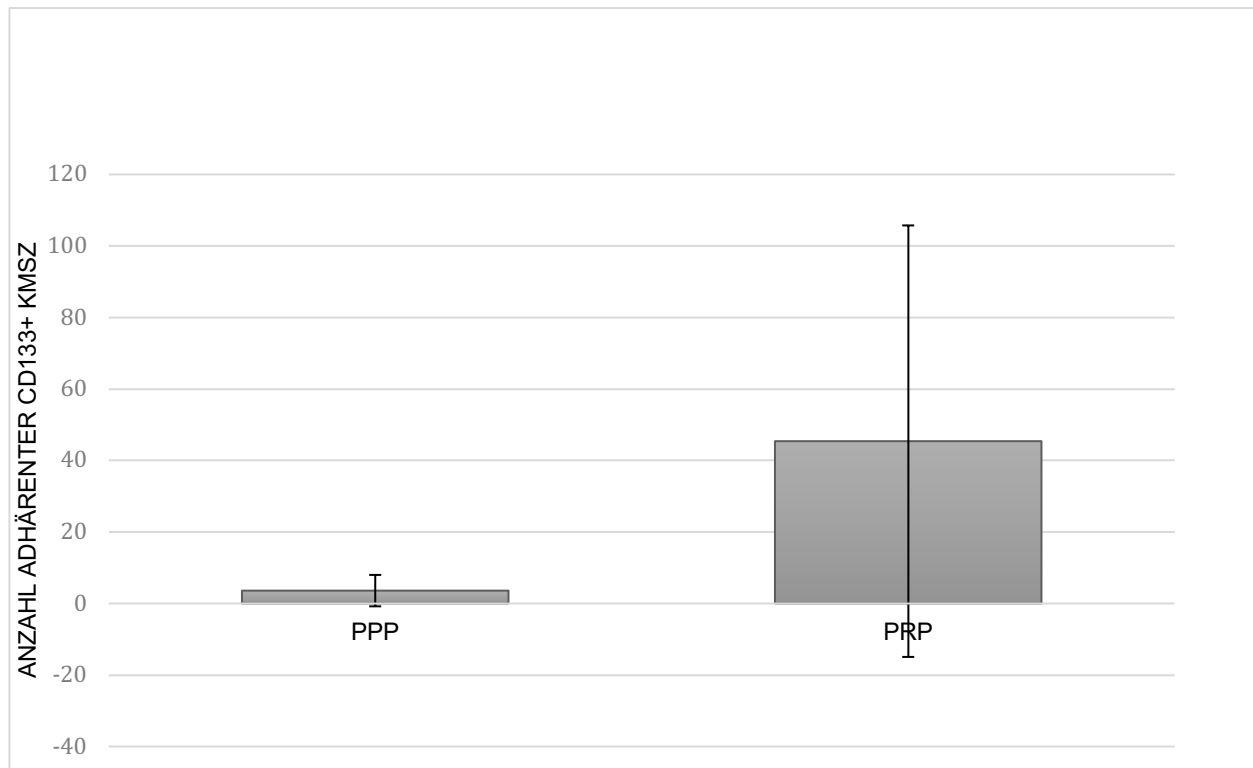


Abb. 9 Durchschnittliche Anzahl adherenter CD133+ KMSZ nach Inkubation mit PPP vs. PRP. Nach der Inkubation mit PPP waren durchschnittlich 3,6 CD133+ KMSZ ($\pm 4,39$) adherent. Nach der Inkubation mit PRP 45,4 CD133+ KMSZ ($\pm 60,34$), $p=0.101$. CD = Cluster of Differentiation, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, PPP = Platelet Poor Plasma, PRP = Platelet Rich Plasma, Signifikanzniveau $p < 0,05$

4.3.2 Einfluss der P-Selectin/PSGL-1-Achse auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

Um den Einfluss der P-Selectin/PSGL-1-Achse auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ zu untersuchen, erfolgten die drei nachfolgenden Versuchsansätze.

4.3.2.1 Einfluss der Co-Inkubation des Endothels mit PSGL-1/CD162 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

Zunächst erfolgte die Inkubation der endothelialisierten Kapillare mit rekombinantem humanen PSGL-1/CD162 ($n=3$). Die Endothelzellen des Kontrollkanals wurden mit Zellmedium und PBS inkubiert.

Die Co-Inkubation des Endothelmonolayers mit PSGL-1 führte zu einer Adhäsion von durchschnittlich 16,3 CD133+ KMSZ. Die ausschließliche Inkubation mit PRP führte zu durchschnittlich 25 adherenten CD133+ KMSZ (Tabelle 13).

Tabelle 13 Einzelergebnisse der Versuche (I-III) zum Einfluss von PRP + PSGL-1 vs PRP auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

	I	II	III	Mittelwert	SD
PRP + PSGL-1	17	18	14	16,33	2,081665999
PRP	26	20	29	25	4,582575695

PRP = *Platelet Rich Plasma*, PSGL-1 = *P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1*, CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = *Knochenmarkstammzelle*, SD = *Standardabweichung*

Durch die Inkubation des Endothels mit PSGL-1 zeigt sich eine Abnahme der adhärenenten Zellen. Die Anwendung des gepaarten t-Tests ergibt hierfür mit $p=0.074$ einen nicht signifikanten Trend verminderter Adhärenz unter PSGL-1 co-inkubiertem Endothel im Vergleich zur alleinigen Co-Inkubation mit PRP (Abb. 10).

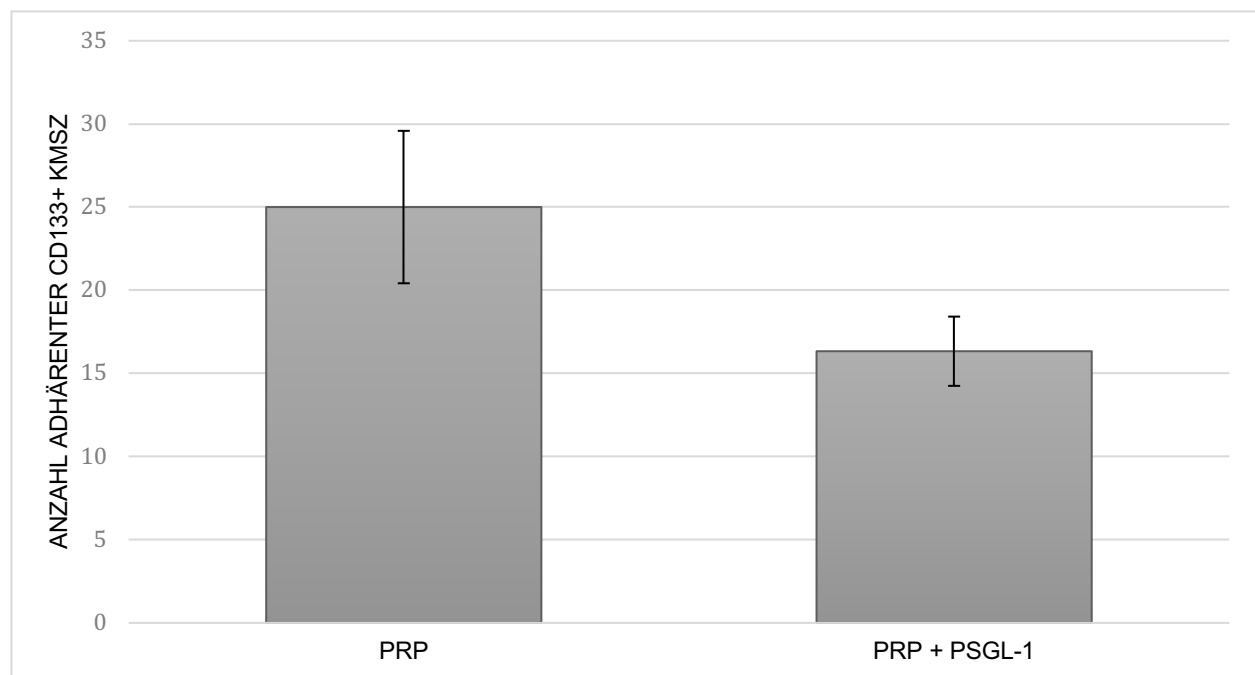


Abb. 10 Vergleich Anzahl adhärenenten CD133+ KMSZ nach Inkubation des Endothels mit PRP +/- PSGL-1. Ohne PSGL-1 behandeltes Endothel zeigte durchschnittlich 25 adhärenente CD133+ KMSZ ($\pm 4,58$). Mit PSGL-1 inkubiertes Endothel zeigte durchschnittlich 16,3 adhärenente CD133+ KMSZ ($\pm 2,08$), $p=0.074$. CD = *Cluster of Differentiation*, PRP = *Platelet Rich Plasma*, PSGL-1 = *P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1*, KMSZ = *Knochenmarkstammzelle*, Signifikanzniveau $p<0,05$

4.3.2.2 Einfluss der Vor-Inkubation von PRP mit KF38789 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ

Des Weiteren (n=6) erfolgte die Inkubation der Thrombozyten mit dem P-Selectin-Inhibitor KF38789. Die Thrombozyten des Kontrollkanals wurden mit DMSO inkubiert.

Durchschnittlich zeigten sich bei der Vor-Inkubation der Thrombozyten mit dem P-Selectin-Inhibitor KF38789 10,5 CD133+ KMSZ am Endothel adhären. Bei Co-Inkubation mit unbehandeltem PRP waren durchschnittlich 26,67 CD133+ KMSZ adhären (Tabelle 14).

Tabelle 14 Einzelergebnisse der Versuche (I-VI) zum Einfluss von PRP + KF38789 vs PRP auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

	I	II	III	IV	V	VI	Mittelwert	SD
PRP + KF38789	5	20	7	17	9	5	10,5	6,442049363
PRP	7	40	82	8	14	9	26,67	29,82392775

PRP = *Platelet Rich Plasma*, KF38789 = Inhibitor von P-Selectin, CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, SD = Standardabweichung

Die Blockade von thrombozytärem P-Selectin führt demnach zu einer Abnahme der adhären CD133+ KMSZ. Unter Berücksichtigung des gepaarten t-Tests entspricht dies mit $p=.133$ einem nicht signifikanten Ergebnis, trotz Abnahme der Adhärenz der Zellen in 5 von 6 Versuchen (Abb.11).

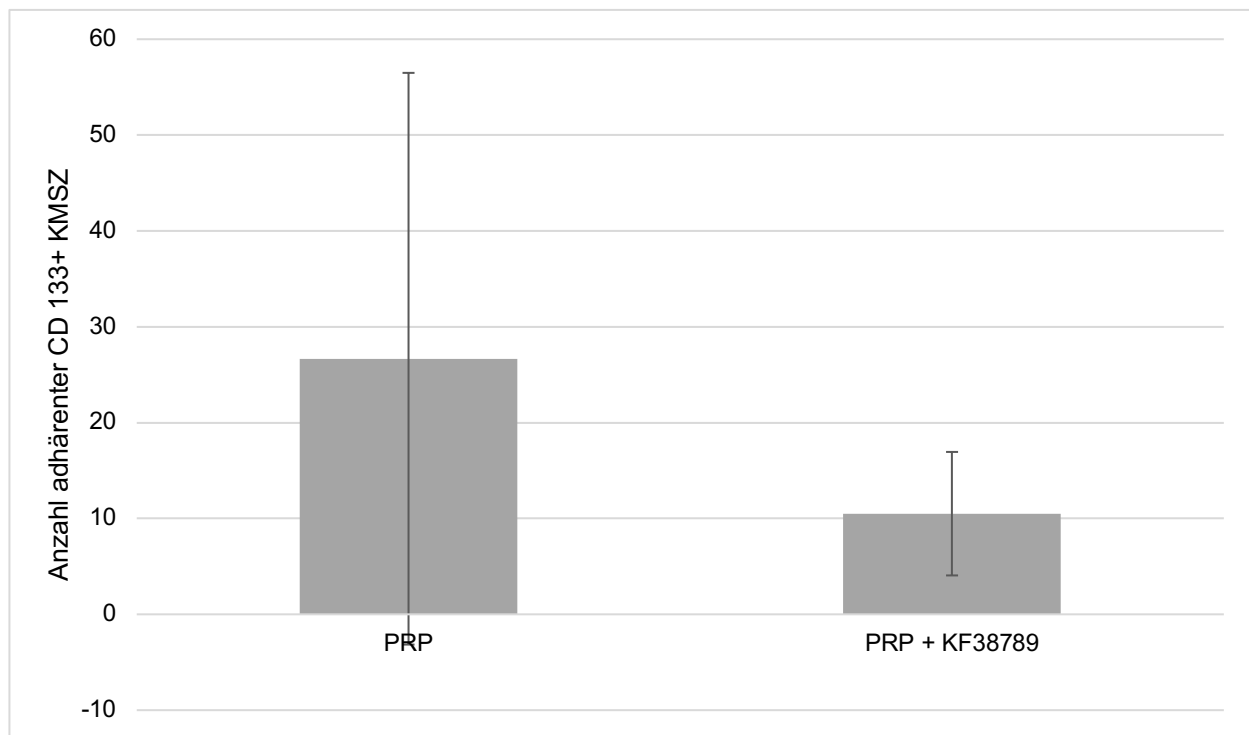


Abb. 11 Vergleich Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ nach Inkubation der Thrombozyten (PRP) +/- KF 38789 Nach Inkubation mit PRP waren durchschnittlich 26,67 CD133+ KMSZ adhären (±29,82), nach zusätzlicher Inkubation des PRP mit KF38789 durchschnittlich 10,5 CD133+ KMSZ (±6,44), $p=0,133$. CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, PRP = *Platelet Rich Plasma*, KF38789 = Inhibitor von P-Selectin, Signifikanzniveau $p<0,05$

4.3.2.3 Einfluss der Co-Inkubation von CD133+ KMSZ mit einem CD162-Antikörper auf die Adhäsion an das Endothel

In der dritten Versuchsreihe ($n=5$) wurden die CD133+ KMSZ mit einem CD162-Antikörper (CD162 = PSGL-1) vorbehandelt. Die KMSZ für den Kontrollkanal wurden mit Zellmedium und destilliertem Wasser inkubiert.

Die Co-Inkubation der CD133+ KMSZ mit CD162 Antikörper ergab am Endothel durchschnittlich 5,2 adhären CD133+ KMSZ. Ohne Co-Inkubation waren durchschnittlich 16,8 CD133+ KMSZ adhären (Tabelle 15).

Tabelle 15 Einzelergebnisse der Versuche (I-V) zum Einfluss von PRP + CD162 Antikörper vs. PRP auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	SD
PRP + CD162 Antikörper	3	2	10	4	7	5,2	3,271085447
PRP	5	13	36	14	16	16,8	11,5195486

PRP = *Platelet Rich Plasma*, CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, SD = Standardabweichung

Durch die Blockade von CD162/PSGL-1 auf der Zelloberfläche der CD133+ KMSZ zeigte sich eine signifikante Abnahme der adhärenenten CD133+ KMSZ mit $p=.02$ im t-Test (Abb. 12).

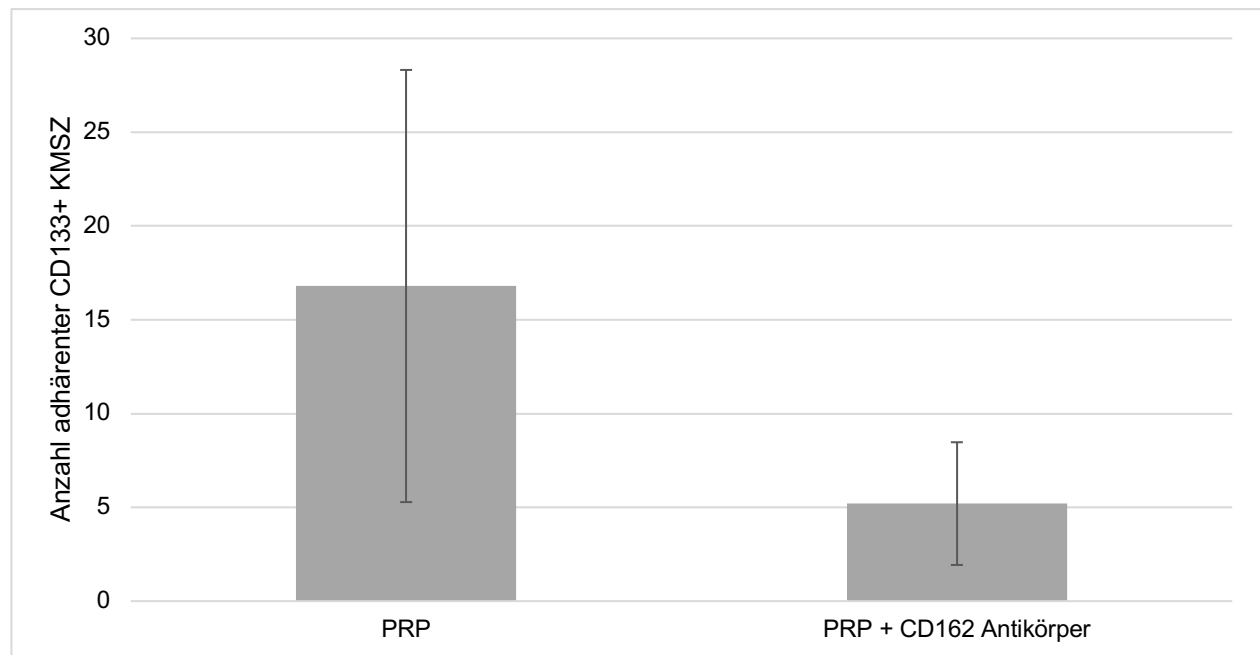


Abb. 12 Vergleich Anzahl adhärenenten CD133+ KMSZ nach Inkubation der KMSZ +/- CD162-Antikörper. Ohne Blockade waren durchschnittlich 16,8 CD133+ KMSZ adhärenent ($\pm 11,52$). Nach Inkubation mit dem CD162-Antikörper waren durchschnittlich 5,2 CD133+ KMSZ adhärenent ($\pm 3,27$), $p=.02$. CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, PRP = *Platelet Rich Plasma*, Signifikanzniveau $p<0,05$

4.3.3 Einfluss von PECAM-1 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ entlang des Endothels

Um den Einfluss der PECAM-1-Achse auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ zu untersuchen erfolgten zwei Versuchsansätze.

4.3.3.1 Einfluss der Co-Inkubation des Endothelmonolayers mit PECAM 1.3 IgG auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

Zunächst erfolgte die Inkubation der HMEC-1 mit dem Antagonisten PECAM 1.3 IgG (n=6). Im Kontrollkanal erfolgte die Inkubation mit destilliertem Wasser und Zellmedium.

Die Co-Inkubation des Endothelmonolayers mit PECAM 1.3 IgG führte nach einstündiger Perfusion zu einer durchschnittlichen Adhärenz von 40 CD133+ KMSZ. Die ledigliche Inkubation mit PRP führte zu durchschnittlich 60,67 adhärennten CD133+ KMSZ (Tabelle 16).

Tabelle 16 Einzelergebnisse der Versuche (I-VI) zum Einfluss von PRP + PECAM 1.3 IgG vs. PRP auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

	I	II	III	IV	V	VI	Mittelwert	SD
PRP + PECAM 1.3 IgG	16	107	67	34	10	6	40	39,71397739
PRP	21	184	54	21	13	71	60,67	64,46911405

PRP = *Platelet Rich Plasma*, PECAM = *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*, IgG = *Immunglobulin G*, CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = *Knochenmarkstammzelle*, SD = *Standardabweichung*

Tendenziell führte demnach die Blockade von endothelialelem PECAM-1 zu einer Abnahme der Zelladhäsion um das 1,5-fache. Unter Hinzunahme des gepaarten t-Tests entspricht dies mit $p=.13$ keiner signifikanten Abnahme der Adhäsion (Abb. 13).

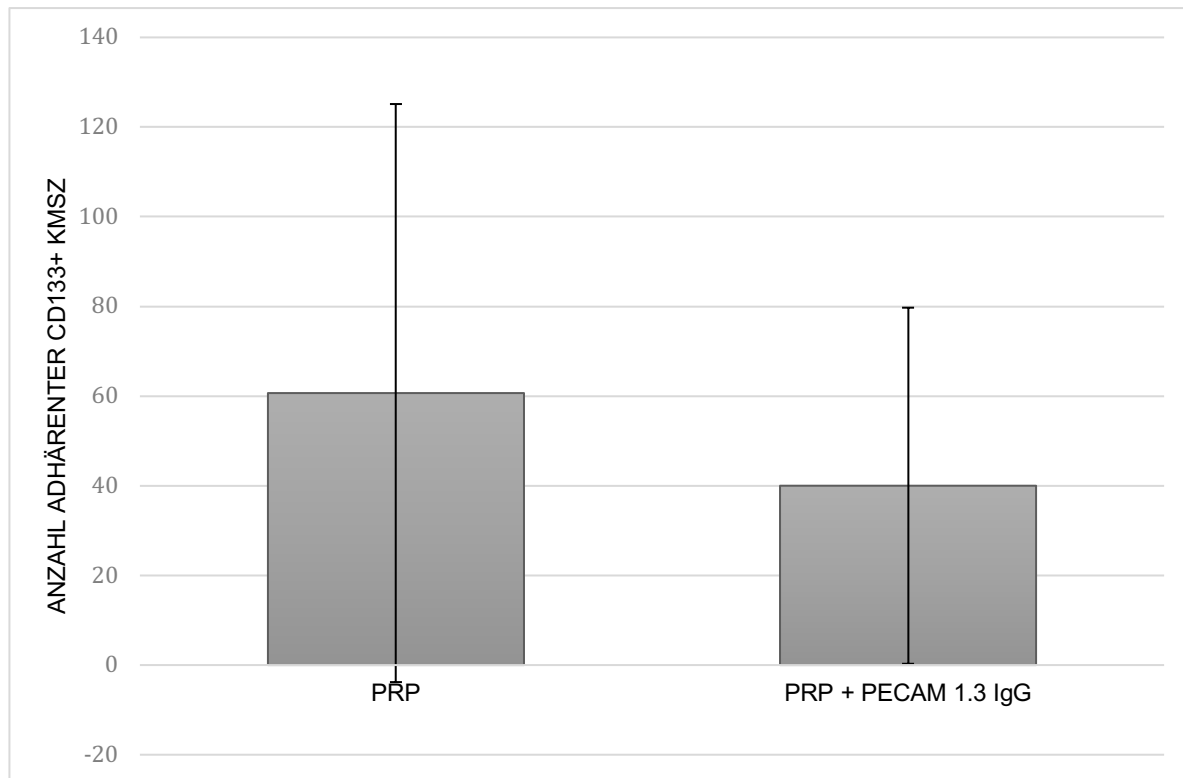


Abb. 13 Vergleich Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ nach Inkubation des Endothels +/- PECAM 1.3 IgG. Ohne Antagonist zeigten sich durchschnittlich 60,67 CD133+ KMSZ adhären ($\pm 64,47$). Nach Inkubation mit PECAM 1.3 IgG waren durchschnittlich 40 CD133+ KMSZ adhären ($\pm 39,71$), $p = .13$. CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = Knochenmarkstammzelle, PECAM = *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*, IgG = Immunglobulin G, PRP = *Platelet Rich Plasma*, Signifikanzniveau $p < 0,05$

4.3.3.2 Einfluss der Co-Inkubation des Endothelmonolayers mit PECAM-1 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

In der zweiten Versuchsreihe ($n=5$) erfolgte die Inkubation der Endothelzellen mit PECAM-1 (CD31). Im Kontrollkanal wurden die HMEC-1 mit destilliertem Wasser und Zellmedium inkubiert.

Die Co-Inkubation mit CD31 führte im Durchschnitt zu 27,6 adhärenen CD133+ KMSZ entlang des Endothels. Ohne die Hinzunahme von CD31 waren es durchschnittlich 23 CD133+ KMSZ (Tabelle 17).

Tabelle 17 Einzelergebnisse der Versuche (I-V) zum Einfluss von PRP + PECAM-1 vs. PRP auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel

	I	II	III	IV	V	Mittelwert	SD
PRP + PECAM-1	0	14	87	22	15	27,6	34,15113468
PRP	22	13	42	25	13	23	11,89537725

PRP = *Platelet Rich Plasma*, PECAM-1 = *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*, CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = *Knochenmarkstammzelle*, SD = *Standardabweichung*

Die zusätzliche Inkubation des HMEC-1 Monolayers mit PECAM-1 (CD31) zeigte keine statistisch signifikante Veränderung der Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ im Vergleich zum Kontrollkanal bei $p=.35$ (Abb. 14).

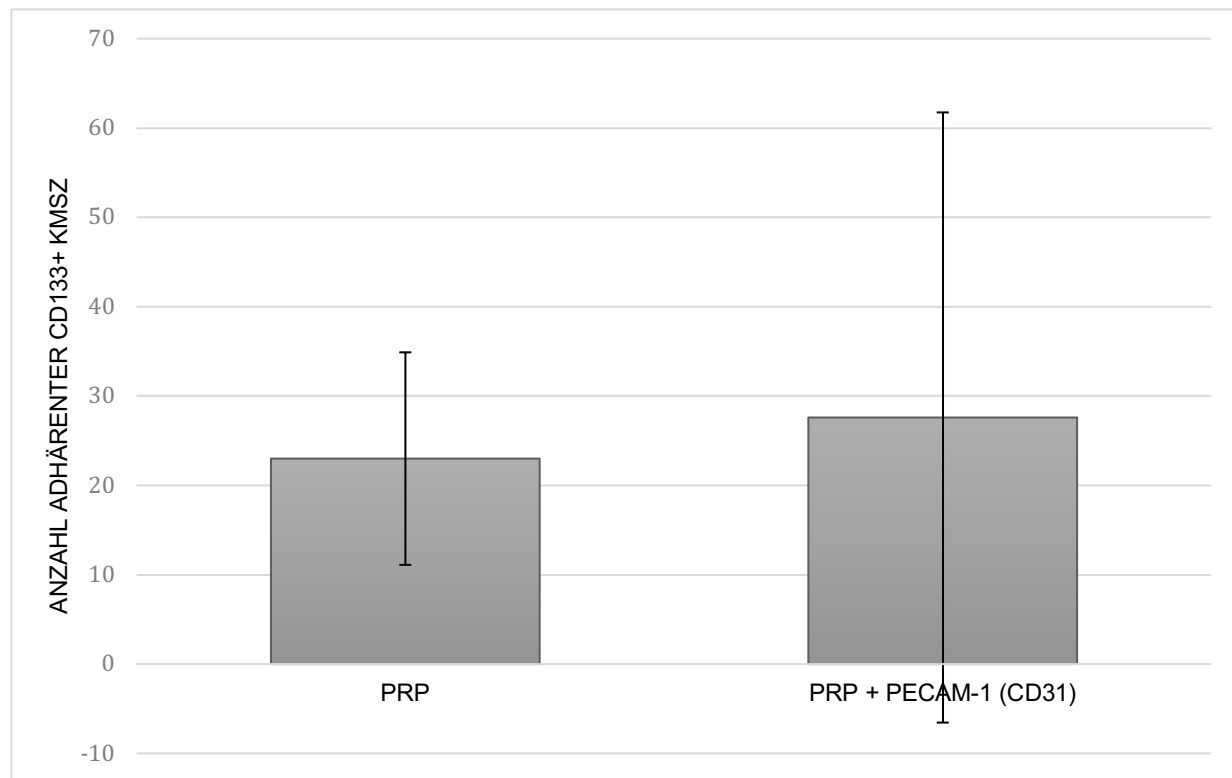


Abb. 14 Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ nach Inkubation +/- PECAM-1. Nach alleiniger Inkubation mit PRP waren durchschnittlich 23 CD133+ KMSZ adhären ($\pm 11,9$). Nach zusätzlicher Inkubation mit PECAM-1 waren durchschnittlich 27,6 CD133+ KMSZ adhären ($\pm 34,15$), $p=.35$. CD = *Cluster of Differentiation*, KMSZ = *Knochenmarkstammzelle*, PECAM-1 = *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*, PRP = *Platelet Rich Plasma*, Signifikanzniveau $p<0,05$

5 Diskussion

Eine eingeschränkte Leberfunktion, z.B. nach PHx, führt zu einer Mobilisation von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) (Schmelzle et al., 2013). Dabei besitzen CD133+ KMSZ das Potential die Leberregeneration nach PHx zu fördern (am Esch et al., 2005, Furst et al., 2007). Der Mechanismus, auf dem diese Fähigkeit beruht, ist bisher weitestgehend unbekannt. Um ein besseres Verständnis über diesen Prozess zu erlangen, wurde in dieser Arbeit unter Zuhilfenahme eines *Live Cell Imaging Systems* die frühe Adhäsion von CD133+ KMSZ an einen Endothelmonolayer und deren Mechanismen untersucht.

Über die Art und Weise, wie Stammzellen zur Regeneration beitragen, liegen, wie bereits erörtert, verschiedene Theorien vor. Unabhängig davon müssen die Stammzellen jedoch in die Leber gelangen und dort an das Endothel adhären. Im Prozess der Rekrutierung von KMSZ wird Thrombozyten eine wichtige Rolle zugesprochen (Massberg et al., 2006). Dernbach et al. zeigten 2008 bei Patienten/-innen mit kardiovaskulären Risikofaktoren, dass die Migration und Anheftung sowie die Anzahl von EPCs durch Inkubation mit Thrombozyten gesunder Probanden gesteigert werden konnte. Die Inkubation von EPCs mit Thrombozyten der Patienten/-innen mit Risikofaktoren führte zu keiner Steigerung. Dieser Effekt wurde durch die von den Thrombozyten ausgeschütteten Faktoren bedingt. Welche Faktoren hier eine Rolle spielten blieb jedoch unklar (Dernbach et al., 2008). Mögliche Adhäsionsmoleküle in diesem Prozess sind P-Selectin und sein Ligand PSGL-1 sowie PECAM-1 (de Boer et al., 2006, Voermans et al., 2000).

Um zu überprüfen, ob diese Mechanismen zum *Homing* der CD133+ KMSZ beitragen, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Co-Kulturmodell unter Verwendung eines *Live Cell Imaging Systems* etabliert. Daten dieser Arbeit legen einen positiven Effekt von Thrombozyten auf die Adhäsion CD133+ KMSZ an das kapilläre Endothel nahe (Lehwald et al., 2020). Um weitere Erkenntnisse über zugrunde liegende Mechanismen der Thrombozyten-geförderten Adhäsion von CD133+ KMSZ an HMEC-1-Endothelzellen unter Scherkräften zu gewinnen, wurde die Rolle von P-Selectin/PSGL-1-Interaktionen und die von PECAM-1 auf das frühe *Homing* evaluiert.

5.1 Thrombozyten unterstützen die Anheftung von CD133+ KMSZ an das mikrovaskuläre Endothel.

Die Co-Inkubation des mikrovaskulären Endothels mit PRP führte zu einer konstanten Steigerung der Adhäsion von CD133+ KMSZ auf das im Mittel 12,6-fache im Vergleich zur Co-Inkubation mit PPP. Aufgrund des variablen Effektes waren die Unterschiede im gepaarten t-Test statistisch ein nicht signifikanter Trend. Weitere gleichartige Versuche zur Steigerung der Zahl an Einzel-Experimenten konnten den in dieser Arbeit gesehenen Trend bzgl. der Adhäsionssteigerung der humanen CD133+ KMSZ unter Flussbedingungen entlang des Mikroendothels durch Thrombozyten Co-Inkubation *in vitro* auf ein statistisch signifikantes Niveau bringen (Lehwald et al., 2020). Der Mechanismus dieses adhäsionssteigernden Effektes von Thrombozyten ist nicht abschließend geklärt. Es gibt hierzu verschiedene Theorien.

So kommen Balaphas et al. in ihrem Review von 2019 zu dem Schluss, dass *platelet-derived extracellular vesicles* (PEVs) eine Aktivierung des Leberendothels hervorrufen können. Diese Aktivierung wiederum fördert das *Homing* von Monozyten und Neutrophilen sowie die Ausschüttung von Zytokinen (Balaphas et al., 2019). Die Ausschüttung von PEVs erfolgt jedoch durch aktivierte Thrombozyten. Eine Aktivierung kann durch Agonisten, wie beispielsweise Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin, gemeinsam mit geringem *shear stress* (Giacomazzi et al., 2016) ausgelöst werden. Die Ausschüttung von PEVs, als thrombozytärer Mechanismus zur Steigerung der Adhäsion der CD133+ KMSZ, scheint in dem hier untersuchten Setting keine relevante Rolle zu spielen. Dies entspricht anderen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die keine weitere Steigerung der Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ durch Aktivierung von Thrombozyten mit ADP zeigen konnte (Lehwald et al., 2020).

Neben PEVs könnte auch der direkte Zell-Zell-Kontakt zwischen Endothel und Thrombozyten zu einer Endothelaktivierung führen. Hierauf weisen unter anderem Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Proença-Ferreira hin. Sowohl Thrombozyten von gesunden Probanden als auch Thrombozyten von Patienten/-innen mit Sichelzellanämie riefen eine Expression von *Intercellular Adhesion Molecule - 1* (ICAM-1) und E-Selectin auf der Zelloberfläche von *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (HUVECs) hervor. In weiterführenden Untersuchungen mit den Thrombozyten der erkrankten Probanden war hierfür ein direkter Kontakt oder eine feste Bindung notwendig (Proença-Ferreira et al., 2014). Weitere Adhäsionsmoleküle wurden nicht untersucht. Lalor et al. konnten zeigen, dass unaktivierte Thrombozyten an *Human hepatic sinusoidal endothelial cells* (HSEC) binden können. Die dadurch ausgelöste Signaltransduktion führte zu einer gesteigerten

Adhäsion von Lymphozyten und Neutrophilen (Lalor et al., 2013). Die hier überwiegend genutzten Zellen (HSEC) wurden aus humanem Lebergewebe gewonnen. Ob diese Ergebnisse auf die in dieser Arbeit verwendeten HMEC-1 vorbehaltlos übertragen werden können ist unklar. Lalor und Kollegen verglichen in derselben Studie die Bindungshäufigkeit von Thrombozyten an HSECs und HUVECs. HUVECs zeigten geringere Interaktionsraten mit Thrombozyten, sodass ein Unterschied zu HMEC-1 wahrscheinlich erscheint.

In Untersuchungen zu inflammatorischen Prozessen entlang von Mikrogefäßendothel fand die Arbeitsgruppe um Zuchtriegel heraus, dass Thrombozyten Leukozyten an die Stellen der Extravasation lotsen. Ein großer Anteil adhärenter Neutrophiler sowie inflammatorischer Monozyten (iMOs) standen direkt mit Thrombozyten in Kontakt. Für die Interaktion zwischen Neutrophilen und Thrombozyten waren CD40 und P-Selectin sowie ihre jeweiligen Liganden notwendig. An Thrombozyten gebundene Neutrophile zeigten ein höheres Maß an Aktivierung. Hierbei scheint ein Zustand hoher Affinität von $\beta 2$ -Integrinen durch die Bindung von PSGL-1 und P-Selectin erreicht zu werden (Zuchtriegel et al., 2016).

Kirton et al. zeigten in ihrer Studie unter Verwendung eines *flow-based assays*, dass Thrombozyten notwendig für die Adhäsion neutrophiler Zellen an einen konfluenten HMEC-1 Monolayer waren. Es reichte bereits eine geringe Anzahl an adhärenenten Thrombozyten für Interaktionen mit Neutrophilen aus. Interessanterweise zeigte eine Vor-Aktivierung der Thrombozyten keine Steigerung der Adhäsionen. Die initiale Verbindung zwischen Neutrophilen und Thrombozyten war abhängig von P-Selectin (Kirton and Nash, 2000).

Langer et al. überprüften die Auswirkung von Thrombozyten auf die Migration und Differenzierung von murinen embryonalen EPCs. Hierbei zeigte sich, dass Thrombozyten zum einen die Migration der EPCs positiv beeinflussen und zum anderen, dass die EPCs abhängig von P-Selectin und PSGL-1 an Thrombozyten binden. Des Weiteren konnte nach mehrtägiger Co-Inkubation eine Differenzierung zu endothelialen Zellen nachgewiesen werden. Die Adhäsion an Thrombozyten sowie die Anregung zur Differenzierung konnte auf humane CD34+ Zellen übertragen werden (Langer et al., 2006).

Diese Arbeiten schreiben den Thrombozyten eine Funktion als Anker für Stammzellen bzw. Leukozyten zu. Diese Theorie scheint auch für diese Arbeit die zutreffendste zu sein. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass in dieser Versuchsreihe die Steigerung der Anzahl

adhärenter CD133+ KMSZ nach Inkubation mit PRP im Vergleich zu PPP nicht signifikant war. In gepoolten Daten der Arbeitsgruppe und der damit einhergehenden größeren Anzahl an Datensätzen wurde eine signifikante Steigerung nachgewiesen (Lehwald et al., 2020), sodass die Co-Inkubation mit PRP in den weiteren Versuchsgruppen fortgeführt wurde.

5.2 Einfluss von P-Selectin/PSGL-1 auf die Adhäsion von CD133+ KMSZ

5.2.1 Inkubation des Endothelmonolayers mit PSGL-1 führt zu einer tendenziellen Abnahme der Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ

Unter der Vorinkubation des HMEC-1 Monolayers mit PSGL-1 zeigte sich eine tendenzielle Abnahme der Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ.

An Endothelzellen wird sowohl E-Selectin, P-Selectin als auch PSGL-1 exprimiert (da Costa Martins et al., 2007, McEver et al., 1989, Bevilacqua et al., 1987). PSGL-1 kann neben P-Selectin auch E-Selectin sowie L-Selectin binden (McEver, 2002, Katayama et al., 2003).

Eine mögliche Erklärung für die Abnahme der Anzahl adhärenter KMSZ in dieser Arbeit ist, dass das lösliche PSGL-1 an P-Selectin der Endothelzellen und im späteren Versuchsablauf an das der Thrombozyten bindet. Damit stünde P-Selectin, da bereits gebunden, nicht mehr als Ligand für PSGL-1 der CD133+ KMSZ zur Verfügung.

Die Arbeitsgruppe um da Costa Martins zeigte, dass endotheliales PSGL-1 P-Selectin nur nach Aktivierung funktionell bindet. Weiterhin ist die Bindung an L-Selectin möglich (da Costa Martins et al., 2007). Eine Aktivierung durch Zytokine, wie den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), liegt in dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht vor. Ob eine Stimulation des Endothels, z.B. durch Bindung von Thrombozyten stattfindet, wurde nicht überprüft. Da sich eine tendenzielle Abnahme der adhärenten Zellen zeigt, lässt sich vermuten, dass L-Selectin keine wesentliche Rolle in dem frühen *Homing* Prozess der CD133+ KMSZ spielt. Dies stimmt mit anderen Untersuchungen überein, in denen gezeigt wurde, dass endotheliales P- und E-Selectin *Rolling* von HPC im KM vermitteln, L-Selectin der HPCs jedoch keinen Einfluss nimmt (Mazo et al., 1998).

Endotheliales PSGL-1 scheint eine untergeordnete Rolle in der Bindung von CD133+ KMSZ zu spielen. Die Abnahme der adhärenten KMSZ deutet möglicherweise darauf hin, dass endotheliales P-Selectin oder E-Selectin in den Prozess des *Homings* involviert sind, obwohl es sich „nur“ um eine Tendenz handelt. Ob die Bindung der CD133+ KMSZ endothel- oder thrombozytenvermittelt ist, lässt sich hier nicht

unterscheiden. Aufgrund der geringen Versuchsanzahl (n=3) haben diese Ergebnisse und Ableitungen eine eingeschränkte Aussagekraft und bedürfen weiterer Untersuchungen. Insgesamt könnten diese präliminären Daten jedoch die Hypothese stützen, dass von KMSZ exprimiertes PSGL-1 für die Adhäsion entlang des Endothels notwendig ist.

5.2.2 Die Blockade von thrombozytärem P-Selectin führt zu keiner signifikanten Reduktion adhärenter CD133+ KMSZ

In der folgenden Versuchsreihe wurde durch den P-Selectin Antagonisten KF38789 thrombozytäres P-Selectin selektiv blockiert (Ohta et al., 2001). Zwar führte dies im Durchschnitt zu einer reduzierten Anzahl adhärenter CD133+ KMSZ, jedoch war der Effekt deutlich geringer als erwartet und nicht signifikant. Demnach scheint die Bindung zwischen thrombozytärem P-Selectin und PSGL-1 keine prädominante Rolle im frühen *Homing* der CD133+ KMSZ zu spielen.

Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von da Costa Martins et al., die zeigten, dass die Bindung zwischen thrombozytärem P-Selectin und auf Monozyten exprimiertem PSGL-1 zu einer erhöhten Zelladhäsion an Adhäsionsmoleküle wie *Vascular Cell Adhesion Molecule - 1* (VCAM-1) und ICAM-1 sowie einer Zellaktivierung mit gesteigerter Integrin Expression führt. Der Effekt durch P-Selectin galt insbesondere, wenn die Monozyten in *Platelet Monocyte Complexes* (PMC) vorlagen. Die Blockade von P-Selectin führte zur Abnahme der Adhäsion. Die gesteigerte Integrin Expression durch Bindung von PSGL-1 und P-Selectin bzw. Thrombozyten führte demnach zu einer gesteigerten Integrin abhängigen Bindung der Monozyten an aktiviertes Endothel (da Costa Martins et al., 2006). Möglicherweise liegt der Grund für diesen Unterschied darin, dass in dieser Arbeit keine Komplexe aus KMSZ und Thrombozyten vorliegen. Eine andere Möglichkeit wäre eine unterschiedliche Struktur von PSGL-1 und eine damit einhergehende veränderte Affinität zu P-Selectin in Abhängigkeit vom Zelltyp. So weist beispielsweise die Bindung zwischen P-Selectin und Eosinophilen eine höhere Affinität auf als die Bindung zu Neutrophilen (Symon et al., 1996). Ein Unterschied zu CD133+ KMSZ scheint daher wahrscheinlich. Ebenso könnten sich HMEC-1 und HUVECs im Bindungsmechanismus unterscheiden.

In der bereits genannten Arbeit von Langer et al. wurde sowohl durch die Blockade von P-Selectin als auch von PSGL-1 das *Rolling* von murinen embryonalen EPCs (eEPCs) über Thrombozyten unterbunden (Langer et al., 2006). Die Thrombozyten waren jedoch auf Kollagen aufgebracht und nicht wie hier auf einem Endothelmonolayer. Daher ist denkbar, dass endotheliales P-Selectin von Relevanz ist. Dole und Kollegen zeigten in

ihrer Studie, dass endotheliales P-Selectin *Rolling* von Leukozyten über das Endothel vermittelt. Des Weiteren kamen sie zu dem Schluss, dass aktivierte Thrombozyten zu einer Ausschüttung von Weibel-Palade-Bodies durch das Endothel führen und damit eine vermehrte Präsentation von P-Selectin auf dem Endothel hervorrufen. Eine Endothelaktivierung wurde etwa zwei Stunden nach Perfusion mit Thrombozyten festgestellt. Dies könnte durch P-Selectin gesteuerte Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate getriggert werden (Dole et al., 2005).

Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die Expression von P-Selectin selbst. P-Selectin wird nach McGregor et al. und anderen vor allem auf aktivierten Thrombozyten exprimiert (McGregor et al., 2006), (McEver, 1995). Im hier verwendeten Ansatz werden jedoch keine aktivierten Thrombozyten verwendet. Ob im Versuchsablauf eine Aktivierung erfolgt, wurde nicht überprüft und kann demnach nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Massberg et al. prüften dies bei ihren Versuchen mit murinen Thrombozyten. Hierbei wurden Thrombozyten mit 250 g bzw. 2000 g zentrifugiert, ohne wesentlichen Nachweis einer Aktivierung (Massberg et al., 1998). In dieser Arbeit wurde mit 180 g bzw. 1000 g zentrifugiert, sodass eine Aktivierung durch die Aufbereitung unwahrscheinlich scheint. Gleiches gilt für die Endothelzellen.

Thrombozytäres P-Selectin scheint für die Adhäsion von CD133+ KMSZ eine untergeordnete Rolle zu spielen. Demnach dürften Thrombozyten durch andere Liganden oder Faktoren bzw. Wirkmechanismen die Adhäsion CD133+ KMSZ positiv beeinflussen. Um diesen Prozess weiter zu beleuchten, sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Wie bereits geschildert, zeigte sich in vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe keine Steigerung der Adhäsion CD133+ KMSZ durch vorherige Aktivierung der Thrombozyten (Duhme et al., 2019, Lehwald et al., 2020). Die Annahme, dass P-Selectin insbesondere in Folge einer Thrombozyten-Aktivierung exprimiert wird, unterstützt diese Interpretation.

5.2.3 Die Blockade von PSGL-1 an der Zelloberfläche der KMSZ führt zu einer Abnahme der Adhäsion von CD133+ KMSZ

In den folgenden Versuchen wurde durch die Verwendung eines Antikörpers PSGL-1 auf den CD133+ KMSZ blockiert. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der am Endothel adhärenen CD133+ KMSZ.

Der verwendete Antikörper wurde initial durch Moore et al. entwickelt. Mit seiner Hilfe wurde demonstriert, dass PSGL-1 für das *Rolling* von Neutrophilen über P-Selectin unter Flussbedingungen notwendig ist und PSGL-1 auf Leukozyten für Bindungen mit

P-Selectin mit hoher Affinität verantwortlich ist. Dabei bindet der Antikörper PSGL-1 spezifisch und blockiert die Bindung unabhängig vom Aktivitätsstatus der Zelle (Moore et al., 1995). Auch *in vivo* konnte die Arbeitsgruppe die Bedeutung von PSGL-1 für das *Rolling* von Leukozyten nachweisen. Hierbei wurde das *Rolling* von humanen polymorphonuklearen Neutrophilen (PMN) und HL-60 Zellen in Ratten nach chirurgischer Intervention durch die Blockade von PSGL-1 signifikant verringert und führte zu einer höheren *Rolling*-Geschwindigkeit (Norman et al., 1995).

Im murinen Modell konnten Vajkoczy et al. nachweisen, dass eEPCs sich in dem Mikrogefäßendothel von Tumorgewebe ansiedeln. Die initiale Adhäsion der eEPCs wurde durch PSGL-1 und die Selectine vermittelt. Um dies zu zeigen, wurden entweder PSGL-1 oder P- und E-Selectin blockiert. Beides führte zu einer deutlichen Abnahme der Adhäsion. Ein Einfluss auf den weiteren *Homing*-Effekt konnte nicht gezeigt werden (Vajkoczy et al., 2003). Die Bedeutung von PSGL-1 und P-/ E-Selectin für das *Homing* humaner CD34+ Zellen in der Mikrovaskulatur des KM zeigten Hidalgo et al. in einem murinen xenograft Modell. Zunächst wurde das *Rolling* und *Homing* CD34+ Zellen in Mäusen mit P- und E-Selectin Mutation untersucht. Für beides zeigte sich eine wichtige Rolle von endothelialem P- und E-Selectin. Durch die Blockade von PSGL-1 auf adulten und auf aus Nabelschnurblut gewonnenen CD34+ Zellen wurde das *Rolling* entlang des KM-Endothels signifikant reduziert (Hidalgo et al., 2002).

Die hier durchgeführten Versuche zeigen die Relevanz von PSGL-1 auch für das frühe *Homing* von CD133+ KMSZ am Endothelmonolayer unter Flussbedingungen. Diese Ergebnisse stimmen mit Lev et al. überein. Die Arbeitsgruppe untersuchte die Bindung von Thrombozyten und frühen EPCs, welche als CD133+ und VEGFR2+ Zellen definiert wurden. Diese wurden isoliert und mit Thrombozyten inkubiert. Sowohl die Blockade von P-Selectin als auch von PSGL-1 verminderte die Anheftung der EPCs an Thrombozyten. Die Gruppe führte Versuche unter statischen sowie unter Flussbedingungen durch. Es ist anzumerken, dass die Blockade von PSGL-1 nur unter statischen Bedingungen erfolgte (Lev et al., 2006).

Die Auswertungen der Anzahl der adhärenen KMSZ in dieser Studie untersuchten nicht, ob diese vorwiegend an Endothelzellen oder an Thrombozyten gebunden sind. In Zusammenschau mit den vorherigen Versuchsreihen scheinen in diesem Modell die endothelialen Liganden (vgl. Absatz 5.2.1) eine wichtige Rolle zu spielen. Weitere Versuche mit der Blockade dieser Liganden könnten weitere Einsichten bringen. Da die Adhäsion der CD133+ KMSZ durch die Blockade von PSGL-1 nicht komplett unterbunden

wurde, ist davon auszugehen, dass alternative Bindungswege vorliegen. Die Identifikation dieser bedarf ebenfalls weiterer Untersuchungen.

5.3 PECAM-1/CD 31 hat keinen signifikanten Einfluss auf das frühe *Homing* von CD133+ KMSZ

In den abschließenden Versuchsreihen wurde die Rolle von PECAM-1 im Prozess der Adhäsion von CD133+ KMSZ an das Endothel untersucht. Im ersten Ansatz wurde endotheliales PECAM-1 durch PECAM 1.3 IgG blockiert. Im zweiten Ansatz wurde der HMEC-1 Monolayer mit *Recombinant Human* CD31/PECAM-1 vorinkubiert. Beide Ansätze zeigten keinen signifikanten Einfluss von PECAM-1 auf die Adhäsion der KMSZ.

Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Yong et al. überein. Durch die Vorinkubation von HUVECs mit einem CD31-Antikörper konnte die Transmigration von CD34+ SZ inhibiert werden. Die Adhäsion der Zellen ans Endothel wurde nicht beeinflusst (Yong et al., 1998). Muller et al. beschrieben, wie bereits erörtert, Ähnliches für die Transmigration von Monozyten und Neutrophilen. Darüber hinaus blieben sowohl Chemotaxis als auch die Bindung der Leukozyten an das Endothel durch die Blockade von PECAM-1 unberührt (Muller et al., 1993). PECAM-1 besteht aus sechs Domänen (Newman et al., 1990)). Liao et al. zeigten, dass PECAM-1 unter Verwendung verschiedener Domänen nicht nur die transendotheliale Migration von Leukozyten, sondern auch die Migration im extrazellulären Raum vermittelt. Hierbei kommen homophile und heterophile Bindungen zum Einsatz (Liao et al., 1995).

Es ist denkbar, dass PECAM-1 zu einem späteren Zeitpunkt im Prozess des *Homings* von KMSZ in die Leber eine Rolle spielt. Die beschriebenen Studien beziehen sich auf Prozesse der Inflammation und des *Homings* von SZ im Knochenmark. Ob dies auf die Migration von KMSZ in geschädigtes Lebergewebe übertragen werden kann, muss weiter untersucht werden.

Wang et al. konnten PECAM-1 sowohl bei hämatopoetischen als auch bei Leberzellen nachweisen (Wang et al., 2003b). Neubauer und Kollegen konnten PECAM-1 entlang der Sinusoide in gesundem und erkranktem humanen Lebergewebe nachweisen. Dabei gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Stärke der Expressierung zwischen erkranktem und gesundem Gewebe. Eine Schlussfolgerung war, dass PECAM-1 möglicherweise weniger als Adhäsionsmolekül fungiert als dass es einen inhibitorischen Effekt ausübt (Neubauer et al., 2000). Anders als Neubauer wiesen Chosay et al. PECAM-1 lediglich im Endothel größerer Lebergefäße nach, jedoch nicht in den Sinusoiden. Im murinen Modell eines Leberschadens durch Endotoxine war das Ausmaß der Inflammation unabhängig von

PECAM-1 (Chosay et al., 1998). Malik et al. zeigten im murinen Modell, dass ein Mangel an PECAM-1 (PECAM-1-ko-Mäuse) mit einer größeren Infiltration neutrophiler Granulozyten sowie einem ausgeprägteren Leberschaden einhergeht. *In vitro* konnte durch Blockade von TNF- α nach Radiatio einer Abnahme von PECAM-1 vorgebeugt werden. PECAM-1 scheint daher wichtig für die Regulation hepatischer Inflammation zu sein. Eine wechselseitige Einflussnahme mit Zytokinen wie TNF- α wird vermutet (Malik et al., 2015).

Im hier genutzten Versuchsaufbau konnte weder die Blockade von endothelialem PECAM-1 durch einen Antikörper noch die Bindungssättigung durch PECAM-1 selbst eine signifikante Reduktion der Adhäsion von CD133+ KMSZ hervorrufen. Somit scheint PECAM-1 keinen Einfluss auf das frühe *Homing* der SZ zu haben. Es ist jedoch denkbar, dass PECAM-1 an den folgenden Schritten des *Homings*, insbesondere der Transmigration in das geschädigte Lebergewebe, beteiligt ist. Das hier verwendete Modell bildet diesen Schritt des *Homings* nicht ab. Daher sind andere Modelle zur Evaluation notwendig.

5.4 Patientenkollektiv – inhomogene Voraussetzungen

Im Gegensatz zu präklinischen Modellen, z.B. mit murinen Zellen, liegt in dieser Arbeit ein insgesamt heterogenes Patientenkollektiv mit unterschiedlichen Grunderkrankungen und unterschiedlicher Physis vor. Diese Heterogenität ist ein möglicher Faktor für die in dieser Arbeit beobachtete Streubreite der Intensität der Effekte. So zeigten sich in den Versuchsreihen zum Einfluss von Thrombozyten und zwei weiteren zum Einfluss von PSGL-1 gleichförmige Effekte, jedoch ohne Signifikanz im t-Test. Im murinen Modell der eigenen Arbeitsgruppe konnte bei gleicher Versuchszahl (n=5) eine signifikante Steigerung der Adhärenz von KMSZ sowohl entlang von dermalem als auch von sinusoidalem Endothel nachgewiesen werden (Lehwald et al., 2020). Auch die „Reinheit“ der aufgearbeiteten KMSZ könnte hierdurch variieren. Eine FACS-Analyse wäre bei allen Versuchen wünschenswert gewesen. Angesichts der begrenzten Ausbeute an CD133+ KMSZ aus den einzelnen Patientenproben war diese jedoch nicht immer methodisch möglich.

5.5 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit wurde das frühe *Homing* von CD133+ KMSZ entlang eines Endothelmonolayers mit Hilfe eines Co-Kulturmodells aus humanen Endothelzellen, Thrombozyten und CD133+ KMSZ in einem *Live Cell Imaging* System untersucht.

Thrombozyten scheinen die Adhäsion der CD133+ KMSZ zu fördern. Der zugrundeliegende Mechanismus bleibt jedoch noch in Teilen unklar und scheint multifaktoriell bzw. auf unterschiedlichen Rezeptor-Liganden-Interaktionen begründet zu sein. Thrombozytärem P-Selectin scheint nur ein Teileffekt bei der Bindung von CD133+ KMSZ am Mikrogefäßendothel zuzukommen.

Dem gegenüber kommt auf CD133+ KMSZ exprimiertem PSGL-1 in diesem Prozess eine relevantere Bedeutung zu. So kam es durch die Blockade von diesem Liganden zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion von CD133+ KMSZ entlang des Mikroendothels *in vitro*. Somit spielen in diesem Modell offensichtlich unterschiedliche Varianten endothelialer Selectine eine Rolle für die thrombozytär geförderte KMSZ-Bindung.

Um den Mechanismus des *Homings* von CD133+ KMSZ im Ganzen zu verstehen, sind weitere experimentelle Ansätze notwendig, die auch spätere Schritte, wie die Transmigration der Zellen, untersuchen. Hier bedarf es weiterer Versuche in Modellen mit Berücksichtigung der Mikroarchitektur der Leber.

Zusammenfassend bietet die Identifikation der wesentlichen Liganden der Adhäsion von CD133+ KMSZ einen interessanten Ansatz zur Verbesserung therapeutischer Konzepte in der Stammzelltherapie der Leber und möglicherweise auch anderer Organsysteme.

Literaturverzeichnis

- ALISON, M. R., ISLAM, S. & LIM, S. 2009. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol*, 217, 282-98.
- ALISON, M. R., POULSOM, R., JEFFERY, R., DHILLON, A. P., QUAGLIA, A., JACOB, J., NOVELLI, M., PRENTICE, G., WILLIAMSON, J. & WRIGHT, N. A. 2000. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature*, 406, 257.
- ALKOZAI, E. M., NIJSTEN, M. W., DE JONG, K. P., DE BOER, M. T., PEETERS, P. M., SLOOFF, M. J., PORTE, R. J. & LISMAN, T. 2010. Immediate postoperative low platelet count is associated with delayed liver function recovery after partial liver resection. *Ann Surg*, 251, 300-6.
- AM ESCH, J. S., 2ND, KNOEFEL, W. T., KLEIN, M., GHODSIZAD, A., FUERST, G., POLL, L. W., PIECHACZEK, C., BURCHARDT, E. R., FEIFEL, N., STOLDT, V., STOCKSCHLADER, M., STOECKLEIN, N., TUSTAS, R. Y., EISENBERGER, C. F., PEIPER, M., HAUSSINGER, D. & HOSCH, S. B. 2005. Portal application of autologous CD133+ bone marrow cells to the liver: a novel concept to support hepatic regeneration. *Stem Cells*, 23, 463-70.
- ANDERSON, G. H., HELLMUMS, J. D., MOAKE, J. & ALFREY, C. P., JR. 1978. Platelet response to shear stress: changes in serotonin uptake, serotonin release, and ADP induced aggregation. *Thromb Res*, 13, 1039-47.
- ANDREONE, P., CATANI, L., MARGINI, C., BRODOSI, L., LORENZINI, S., SOLLAZZO, D., NICOLINI, B., GIORDANO, R., MONTEMURRO, T., RIZZI, S., DAN, E., GIUDICE, V., VIGANO, M., CASADEI, A., FOSCHI, F. G., MALVI, D., BERNARDI, M., CONTI, F. & LEMOLI, R. M. 2015. Reinfusion of highly purified CD133(+) bone marrow-derived stem/progenitor cells in patients with end-stage liver disease: A phase I clinical trial. *Dig Liver Dis*, 47, 1059-66.
- BALAPHAS, A., MEYER, J., SADOUL, K., FONTANA, P., MOREL, P., GONELLE-GISPERT, C. & BÜHLER, L. H. 2019. Platelets and Platelet-Derived Extracellular Vesicles in Liver Physiology and Disease. *Hepatol Commun*, 3, 855-866.
- BEVILACQUA, M. P., POBER, J. S., MENDRICK, D. L., COTRAN, R. S. & GIMBRONE, M. A., JR. 1987. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9238-42.
- BLAIR, P. & FLAUMENHAFT, R. 2009. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23, 177-89.
- BOGEN, S., PAK, J., GARIFALLOU, M., DENG, X. & MULLER, W. A. 1994. Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med*, 179, 1059-64.
- CHOSAY, J. G., FISHER, M. A., FARHOOD, A., READY, K. A., DUNN, C. J. & JAECHKE, H. 1998. Role of PECAM-1 (CD31) in neutrophil transmigration in murine models of liver and peritoneal inflammation. *Am J Physiol*, 274, G776-82.
- DA COSTA MARTINS, P., GARCIA-VALLEJO, J. J., VAN THIENEN, J. V., FERNANDEZ-BORJA, M., VAN GILS, J. M., BECKERS, C., HORREVOETS, A. J., HORDIJK, P. L. & ZWAGINGA, J. J. 2007. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1023-9.
- DA COSTA MARTINS, P. A., VAN GILS, J. M., MOL, A., HORDIJK, P. L. & ZWAGINGA, J. J. 2006. Platelet binding to monocytes increases the adhesive properties of

- monocytes by up-regulating the expression and functionality of beta1 and beta2 integrins. *J Leukoc Biol*, 79, 499-507.
- DANGERFIELD, J., LARBI, K. Y., HUANG, M. T., DEWAR, A. & NOURSHARGH, S. 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J Exp Med*, 196, 1201-11.
- DE BOER, H. C., VERSEYDEN, C., ULFMAN, L. H., ZWAGINGA, J. J., BOT, I., BIESSEN, E. A., RABELINK, T. J. & VAN ZONNEVELD, A. J. 2006. Fibrin and activated platelets cooperatively guide stem cells to a vascular injury and promote differentiation towards an endothelial cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1653-9.
- DERNBACH, E., RANDRIAMBOAVONJY, V., FLEMING, I., ZEIHNER, A. M., DIMMELER, S. & URBICH, C. 2008. Impaired interaction of platelets with endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk factors. *Basic Res Cardiol*, 103, 572-81.
- DOLE, V. S., BERGMEIER, W., MITCHELL, H. A., EICHENBERGER, S. C. & WAGNER, D. D. 2005. Activated platelets induce Weibel-Palade-body secretion and leukocyte rolling in vivo: role of P-selectin. *Blood*, 106, 2334-9.
- DONMEZ, A., TOMBULOGLU, M., GULBAHAR, O., ARIK, B., CAGIRGAN, S., VURAL, F. & GOKMEN, N. 2013. CD31 expression on peripheral blood stem cells predicts both early neutrophil and platelet engraftments. *Transfus Apher Sci*, 49, 307-12.
- DUHME, C., LEHWALD, N., KEHREL, B. E., BAUCHROWITZ, E., NGEPI, A., SCHMELZLE, M., KOLOKOTRONIS, T., BENHIDJEB, T., KRUGER, M., JURK, K., KNOEFEL, W. T., ROBSON, S. C. & SCHULTE AM ESCH, J. 2019. CD133(+) bone marrow stem cells (BMSC) control platelet activation - Role of ectoNTPDase-1 (CD39). *Blood Cells Mol Dis*, 77, 142-148.
- EOM, Y. W., KIM, G. & BAIK, S. K. 2015. Mesenchymal stem cell therapy for cirrhosis: Present and future perspectives. *World J Gastroenterol*, 21, 10253-61.
- FRENETTE, P. S., DENIS, C. V., WEISS, L., JURK, K., SUBBARAO, S., KEHREL, B., HARTWIG, J. H., VESTWEBER, D. & WAGNER, D. D. 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med*, 191, 1413-22.
- FRENETTE, P. S., SUBBARAO, S., MAZO, I. B., VON ANDRIAN, U. H. & WAGNER, D. D. 1998. Endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule-1 promote hematopoietic progenitor homing to bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 14423-8.
- FURST, G., SCHULTE AM ESCH, J., POLL, L. W., HOSCH, S. B., FRITZ, L. B., KLEIN, M., GODEHARDT, E., KRIEG, A., WECKER, B., STOLDT, V., STOCKSCHLADER, M., EISENBERGER, C. F., MODDER, U. & KNOEFEL, W. T. 2007. Portal vein embolization and autologous CD133+ bone marrow stem cells for liver regeneration: initial experience. *Radiology*, 243, 171-9.
- GEHLING, U. M., ERGUN, S., SCHUMACHER, U., WAGENER, C., PANTEL, K., OTTE, M., SCHUCH, G., SCHAFFHAUSEN, P., MENDE, T., KILIC, N., KLUGE, K., SCHAFER, B., HOSSFELD, D. K. & FIEDLER, W. 2000. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*, 95, 3106-12.
- GEHLING, U. M., WILLEMS, M., DANDRI, M., PETERSEN, J., BERNA, M., THILL, M., WULF, T., MULLER, L., POLLOK, J. M., SCHLAGNER, K., FALTZ, C.,

- HOSSFELD, D. K. & ROGIERS, X. 2005. Partial hepatectomy induces mobilization of a unique population of haematopoietic progenitor cells in human healthy liver donors. *J Hepatol*, 43, 845-53.
- GIACOMAZZI, A., DEGAN, M., CALABRIA, S., MENEGUZZI, A. & MINUZ, P. 2016. Antiplatelet Agents Inhibit the Generation of Platelet-Derived Microparticles. *Front Pharmacol*, 7, 314.
- GOLEBIEWSKA, E. M. & POOLE, A. W. 2015. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*, 29, 153-62.
- GREMMEL, T., FRELINGER, A. L., 3RD & MICHELSON, A. D. 2016. Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*, 42, 191-204.
- HARRIS, R. G., HERZOG, E. L., BRUSCIA, E. M., GROVE, J. E., VAN ARNAM, J. S. & KRAUSE, D. S. 2004. Lack of a fusion requirement for development of bone marrow-derived epithelia. *Science*, 305, 90-3.
- HASHIMOTO, K., KATAOKA, N., NAKAMURA, E., HAGIHARA, K., OKAMOTO, T., KANOUCHI, H., MOHRI, S., TSUJIOKA, K. & KAJIYA, F. 2012. Live-cell visualization of the trans-cellular mode of monocyte transmigration across the vascular endothelium, and its relationship with endothelial PECAM-1. *J Physiol Sci*, 62, 63-9.
- HIDALGO, A., WEISS, L. A. & FRENETTE, P. S. 2002. Functional selectin ligands mediating human CD34(+) cell interactions with bone marrow endothelium are enhanced postnatally. *J Clin Invest*, 110, 559-69.
- IBRAHIM, S. F. & VAN DEN ENGH, G. 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 106, 19-39.
- JANG, Y. Y., COLLECTOR, M. I., BAYLIN, S. B., DIEHL, A. M. & SHARKIS, S. J. 2004. Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol*, 6, 532-9.
- JANOWSKA-WIECZOREK, A., MAJKA, M., KIJOWSKI, J., BAJ-KRZYWORZEKA, M., RECA, R., TURNER, A. R., RATAJCZAK, J., EMERSON, S. G., KOWALSKA, M. A. & RATAJCZAK, M. Z. 2001. Platelet-derived microparticles bind to hematopoietic stem/progenitor cells and enhance their engraftment. *Blood*, 98, 3143-9.
- KALLIS, Y. N., ALISON, M. R. & FORBES, S. J. 2007. Bone marrow stem cells and liver disease. *Gut*, 56, 716-24.
- KANAYASU-TOYODA, T., YAMAGUCHI, T., OSHIZAWA, T. & HAYAKAWA, T. 2003. CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell Physiol*, 195, 119-29.
- KATAYAMA, Y., HIDALGO, A., FURIE, B. C., VESTWEBER, D., FURIE, B. & FRENETTE, P. S. 2003. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin. *Blood*, 102, 2060-7.
- KIRTON, C. M. & NASH, G. B. 2000. Activated platelets adherent to an intact endothelial cell monolayer bind flowing neutrophils and enable them to transfer to the endothelial surface. *J Lab Clin Med*, 136, 303-13.
- KISHORE, R., VERMA, S. K., MACKIE, A. R., VAUGHAN, E. E., ABRAMOVA, T. V., AIKO, I. & KRISHNAMURTHY, P. 2013. Bone marrow progenitor cell therapy-mediated paracrine regulation of cardiac miRNA-155 modulates fibrotic response in diabetic hearts. *PLoS One*, 8, e60161.

- KLEIN, H. M., GHODSIZAD, A., BOROWSKI, A., SALEH, A., DRAGANOV, J., POLL, L., STOLDT, V., FEIFEL, N., PIECHARCZEK, C., BURCHARDT, E. R., STOCKSCHLADER, M. & GAMS, E. 2004. Autologous bone marrow-derived stem cell therapy in combination with TMLR. A novel therapeutic option for endstage coronary heart disease: report on 2 cases. *Heart Surg Forum*, 7, E416-9.
- KROLL, M. H., HELLUMS, J. D., MCINTIRE, L. V., SCHAFER, A. I. & MOAKE, J. L. 1996. Platelets and shear stress. *Blood*, 88, 1525-41.
- LAGASSE, E., CONNORS, H., AL-DHALIMY, M., REITSMA, M., DOHSE, M., OSBORNE, L., WANG, X., FINEGOLD, M., WEISSMAN, I. L. & GROMPE, M. 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med*, 6, 1229-34.
- LALOR, P. F., HERBERT, J., BICKNELL, R. & ADAMS, D. H. 2013. Hepatic sinusoidal endothelium avidly binds platelets in an integrin-dependent manner, leading to platelet and endothelial activation and leukocyte recruitment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 304, G469-78.
- LANGER, H., MAY, A. E., DAUB, K., HEINZMANN, U., LANG, P., SCHUMM, M., VESTWEBER, D., MASSBERG, S., SCHONBERGER, T., PFISTERER, I., HATZOPOULOS, A. K. & GAWAZ, M. 2006. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro. *Circ Res*, 98, e2-10.
- LASZIK, Z., JANSEN, P. J., CUMMINGS, R. D., TEDDER, T. F., MCEVER, R. P. & MOORE, K. L. 1996. P-selectin glycoprotein ligand-1 is broadly expressed in cells of myeloid, lymphoid, and dendritic lineage and in some nonhematopoietic cells. *Blood*, 88, 3010-21.
- LEAVESLEY, D. I., OLIVER, J. M., SWART, B. W., BERNDT, M. C., HAYLOCK, D. N. & SIMMONS, P. J. 1994. Signals from platelet/endothelial cell adhesion molecule enhance the adhesive activity of the very late antigen-4 integrin of human CD34+ hemopoietic progenitor cells. *J Immunol*, 153, 4673-83.
- LEHWALD, N., DUHME, C., PINCHUK, I., KIRCHNER, J., WIEFERICH, K., SCHMELZLE, M., JURK, K., WINDMÖLLER, B. A., HÜBNER, W., HOMEY, B., BODE, J., KUBITZ, R., BENHIDJEB, T., KRÜGER, M., ROBSON, S. C., KNOEFEL, W. T., KEHREL, B. E. & SCHULTE AM ESCH, J. 2020. Platelets Boost Recruitment of CD133(+) Bone Marrow Stem Cells to Endothelium and the Rodent Liver-The Role of P-Selectin/PSGL-1 Interactions. *Int J Mol Sci*, 21.
- LEHWALD, N., DUHME, C., WILDNER, M., KUHN, S., FURST, G., FORBES, S. J., JONAS, S., ROBSON, S. C., KNOEFEL, W. T., SCHMELZLE, M. & SCHULTE AM ESCH, J. 2014. HGF and SDF-1-mediated mobilization of CD133+ BMSC for hepatic regeneration following extensive liver resection. *Liver Int*, 34, 89-101.
- LEMOLI, R. M., CATANI, L., TALARICO, S., LOGGI, E., GRAMENZI, A., BACCARANI, U., FOGLI, M., GRAZI, G. L., ALUIGI, M., MARZOCCHI, G., BERNARDI, M., PINNA, A., BRESADOLA, F., BACCARANI, M. & ANDREONE, P. 2006. Mobilization of bone marrow-derived hematopoietic and endothelial stem cells after orthotopic liver transplantation and liver resection. *Stem Cells*, 24, 2817-25.
- LESURTEL, M., GRAF, R., ALEIL, B., WALTHER, D. J., TIAN, Y., JOCHUM, W., GACHET, C., BADER, M. & CLAVIEN, P. A. 2006. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*, 312, 104-7.

- LEV, E. I., ESTROV, Z., ABOULFATOVA, K., HARRIS, D., GRANADA, J. F., ALVIAR, C., KLEIMAN, N. S. & DONG, J. F. 2006. Potential role of activated platelets in homing of human endothelial progenitor cells to subendothelial matrix. *Thromb Haemost*, 96, 498-504.
- LEVESQUE, J. P., ZANNETTINO, A. C., PUDNEY, M., NIUTTA, S., HAYLOCK, D. N., SNAPP, K. R., KANSAS, G. S., BERNDT, M. C. & SIMMONS, P. J. 1999. PSGL-1-mediated adhesion of human hematopoietic progenitors to P-selectin results in suppression of hematopoiesis. *Immunity*, 11, 369-78.
- LI, L., WANG, H., YANG, J., JIANG, L., YANG, J., WANG, W., YAN, L., WEN, T., LI, B. & XU, M. 2015. Immediate Postoperative Low Platelet Counts After Living Donor Liver Transplantation Predict Early Allograft Dysfunction. *Medicine (Baltimore)*, 94, e1373.
- LIAO, F., ALI, J., GREENE, T. & MULLER, W. A. 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *J Exp Med*, 185, 1349-57.
- LIAO, F., HUYNH, H. K., EIROA, A., GREENE, T., POLIZZI, E. & MULLER, W. A. 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med*, 182, 1337-43.
- LU, Q., HOFFERBERT, B. V., KOO, G. & MALINAUSKAS, R. A. 2013. In vitro shear stress-induced platelet activation: sensitivity of human and bovine blood. *Artif Organs*, 37, 894-903.
- MALEK, A. M., ALPER, S. L. & IZUMO, S. 1999. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *Jama*, 282, 2035-42.
- MALIK, I. A., STANGE, I., MARTIUS, G., CAMERON, S., RAVE-FRÄNK, M., HESS, C. F., ELLENRIEDER, V. & WOLFF, H. A. 2015. Role of PECAM-1 in radiation-induced liver inflammation. *J Cell Mol Med*, 19, 2441-52.
- MASSBERG, S., ENDERS, G., LEIDERER, R., EISENMENGER, S., VESTWEBER, D., KROMBACH, F. & MESSMER, K. 1998. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. *Blood*, 92, 507-15.
- MASSBERG, S., KONRAD, I., SCHURZINGER, K., LORENZ, M., SCHNEIDER, S., ZOHLNHOEFER, D., HOPPE, K., SCHIEMANN, M., KENNERKNECHT, E., SAUER, S., SCHULZ, C., KERSTAN, S., RUDELIUS, M., SEIDL, S., SORGE, F., LANGER, H., PELUSO, M., GOYAL, P., VESTWEBER, D., EMAMBOKUS, N. R., BUSCH, D. H., FRAMPTON, J. & GAWAZ, M. 2006. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1alpha and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo. *J Exp Med*, 203, 1221-33.
- MAZO, I. B., GUTIERREZ-RAMOS, J. C., FRENETTE, P. S., HYNES, R. O., WAGNER, D. D. & VON ANDRIAN, U. H. 1998. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med*, 188, 465-74.
- MCEVER, R. P. 1995. Regulation of function and expression of P-selectin. *Agents Actions Suppl*, 47, 117-9.
- MCEVER, R. P. 2002. Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 581-6.
- MCEVER, R. P., BECKSTEAD, J. H., MOORE, K. L., MARSHALL-CARLSON, L. & BAINTON, D. F. 1989. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is

- also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest*, 84, 92-9.
- MCGREGOR, L., MARTIN, J. & MCGREGOR, J. L. 2006. Platelet-leukocyte aggregates and derived microparticles in inflammation, vascular remodelling and thrombosis. *Front Biosci*, 11, 830-7.
- MEYER, J., LEJMI, E., FONTANA, P., MOREL, P., GONELLE-GISPERT, C. & BUHLER, L. 2015. A focus on the role of platelets in liver regeneration: Do platelet-endothelial cell interactions initiate the regenerative process? *J Hepatol*, 63, 1263-71.
- MIYAOKA, Y. & MIYAJIMA, A. 2013. To divide or not to divide: revisiting liver regeneration. *Cell Div*, 8, 8.
- MOORE, K. L., EATON, S. F., LYONS, D. E., LICHENSTEIN, H. S., CUMMINGS, R. D. & MCEVER, R. P. 1994. The P-selectin glycoprotein ligand from human neutrophils displays sialylated, fucosylated, O-linked poly-N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*, 269, 23318-27.
- MOORE, K. L., PATEL, K. D., BRUEHL, R. E., LI, F., JOHNSON, D. A., LICHENSTEIN, H. S., CUMMINGS, R. D., BANTON, D. F. & MCEVER, R. P. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 128, 661-71.
- MOORE, K. L., STULTS, N. L., DIAZ, S., SMITH, D. F., CUMMINGS, R. D., VARKI, A. & MCEVER, R. P. 1992. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*, 118, 445-56.
- MULLER, W. A., BERMAN, M. E., NEWMAN, P. J., DELISSER, H. M. & ALBELDA, S. M. 1992. A heterophilic adhesion mechanism for platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (CD31). *J Exp Med*, 175, 1401-4.
- MULLER, W. A., RATTI, C. M., MCDONNELL, S. L. & COHN, Z. A. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, 170, 399-414.
- MULLER, W. A., WEIGL, S. A., DENG, X. & PHILLIPS, D. M. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, 178, 449-60.
- MURATA, S., HASHIMOTO, I., NAKANO, Y., MYRONOVYCH, A., WATANABE, M. & OHKOHCHI, N. 2008. Single administration of thrombopoietin prevents progression of liver fibrosis and promotes liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats. *Ann Surg*, 248, 821-8.
- MURATA, S., OHKOHCHI, N., MATSUO, R., IKEDA, O., MYRONOVYCH, A. & HOSHI, R. 2007. Platelets promote liver regeneration in early period after hepatectomy in mice. *World J Surg*, 31, 808-16.
- NEUBAUER, K., WILFLING, T., RITZEL, A. & RAMADORI, G. 2000. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 gene expression in liver sinusoidal endothelial cells during liver injury and repair. *J Hepatol*, 32, 921-32.
- NEWMAN, P. J., BERNDT, M. C., GORSKI, J., WHITE, G. C., 2ND, LYMAN, S., PADDOCK, C. & MULLER, W. A. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247, 1219-22.
- NOCITO, A., GEORGIEV, P., DAHM, F., JOCHUM, W., BADER, M., GRAF, R. & CLAVIEN, P. A. 2007. Platelets and platelet-derived serotonin promote tissue repair after normothermic hepatic ischemia in mice. *Hepatology*, 45, 369-76.

- NORMAN, K. E., MOORE, K. L., MCEVER, R. P. & LEY, K. 1995. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*, 86, 4417-21.
- NOWATARI, T., FUKUNAGA, K. & OHKOHCHI, N. 2012. Regulation of signal transduction and role of platelets in liver regeneration. *Int J Hepatol*, 2012, 542479.
- NURDEN, A. T. 2011. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 105 Suppl 1, S13-33.
- OHTA, S., INUJIMA, Y., ABE, M., UOSAKI, Y., SATO, S. & MIKI, I. 2001. Inhibition of P-selectin specific cell adhesion by a low molecular weight, non-carbohydrate compound, KF38789. *Inflamm Res*, 50, 544-51.
- PASZKOWIAK, J. J. & DARDIK, A. 2003. Arterial wall shear stress: observations from the bench to the bedside. *Vasc Endovascular Surg*, 37, 47-57.
- POMPILIO, G., CANNATA, A., PECCATORI, F., BERTOLINI, F., NASCIMBENE, A., CAPOGROSSI, M. C. & BIGLIOLI, P. 2004. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg*, 78, 1808-12.
- PROENÇA-FERREIRA, R., BRUGNEROTTO, A. F., GARRIDO, V. T., DOMINICAL, V. M., VITAL, D. M., RIBEIRO MDE, F., DOS SANTOS, M. E., TRAINA, F., OLALLA-SAAD, S. T., COSTA, F. F. & CONRAN, N. 2014. Endothelial activation by platelets from sickle cell anemia patients. *PLoS One*, 9, e89012.
- ROTHER, G. 2007. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. *Zelluläre Diagnostik*. Karger Publishers.
- SACHS, U. J., ANDREI-SELMER, C. L., MANIAR, A., WEISS, T., PADDOCK, C., ORLOVA, V. V., CHOI, E. Y., NEWMAN, P. J., PREISSNER, K. T., CHAVAKIS, T. & SANTOSO, S. 2007. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem*, 282, 23603-12.
- SADRI, A. R., JESCHKE, M. G. & AMINI-NIK, S. 2016. Advances in Liver Regeneration: Revisiting Hepatic Stem/Progenitor Cells and Their Origin. *Stem Cells Int*, 2016, 7920897.
- SANG, Y., ROEST, M., DE LAAT, B., DE GROOT, P. G. & HUSKENS, D. 2021. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev*, 46, 100733.
- SCHMELZLE, M., DUHME, C., JUNGER, W., SALHANICK, S. D., CHEN, Y., WU, Y., TOXAVIDIS, V., CSIZMADIA, E., HAN, L., BIAN, S., FÜRST, G., NOWAK, M., KARP, S. J., KNOEFEL, W. T., ESCH, J. S. A. & ROBSON, S. C. 2013. CD39 modulates hematopoietic stem cell recruitment and promotes liver regeneration in mice and humans after partial hepatectomy. *Ann Surg*, 257, 693-701.
- STAMM, C., WESTPHAL, B., KLEINE, H. D., PETZSCH, M., KITTNER, C., KLINGE, H., SCHUMICHEN, C., NIENABER, C. A., FREUND, M. & STEINHOFF, G. 2003. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet*, 361, 45-6.
- STENBERG, P. E., MCEVER, R. P., SHUMAN, M. A., JACQUES, Y. V. & BANTON, D. F. 1985. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol*, 101, 880-6.
- STOCKINGER, H., GADD, S. J., EHER, R., MAJDIC, O., SCHREIBER, W., KASINERK, W., STRASS, B., SCHNABL, E. & KNAPP, W. 1990. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol*, 145, 3889-97.

- SUN, J., WILLIAMS, J., YAN, H. C., AMIN, K. M., ALBELDA, S. M. & DELISSER, H. M. 1996. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) homophilic adhesion is mediated by immunoglobulin-like domains 1 and 2 and depends on the cytoplasmic domain and the level of surface expression. *J Biol Chem*, 271, 18561-70.
- SYMON, F. A., LAWRENCE, M. B., WILLIAMSON, M. L., WALSH, G. M., WATSON, S. R. & WARDLAW, A. J. 1996. Functional and structural characterization of the eosinophil P-selectin ligand. *J Immunol*, 157, 1711-9.
- TANAKA, Y., ALBELDA, S. M., HORGAN, K. J., VAN SEVENTER, G. A., SHIMIZU, Y., NEWMAN, W., HALLAM, J., NEWMAN, P. J., BUCK, C. A. & SHAW, S. 1992. CD31 expressed on distinctive T cell subsets is a preferential amplifier of beta 1 integrin-mediated adhesion. *J Exp Med*, 176, 245-53.
- THEISE, N. D., BADVE, S., SAXENA, R., HENEGARIU, O., SELL, S., CRAWFORD, J. M. & KRAUSE, D. S. 2000. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology*, 31, 235-40.
- THORGEIRSSON, S. S. & GRISHAM, J. W. 2006. Hematopoietic cells as hepatocyte stem cells: a critical review of the evidence. *Hepatology*, 43, 2-8.
- TOMIKAWA, M., HASHIZUME, M., HIGHASHI, H., OHTA, M. & SUGIMACHI, K. 1996. The role of the spleen, platelets, and plasma hepatocyte growth factor activity on hepatic regeneration in rats. *J Am Coll Surg*, 182, 12-6.
- TOPPER, J. N. & GIMBRONE, M. A., JR. 1999. Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today*, 5, 40-6.
- TSOLAKI, E., ATHANASIOU, E., GOUNARI, E., ZOGAS, N., SIOTOU, E., YIANGOU, M., ANAGNOSTOPOULOS, A. & YANNAKI, E. 2014. Hematopoietic stem cells and liver regeneration: differentially acting hematopoietic stem cell mobilization agents reverse induced chronic liver injury. *Blood Cells Mol Dis*, 53, 124-32.
- TSOLAKI, E. & YANNAKI, E. 2015. Stem cell-based regenerative opportunities for the liver: State of the art and beyond. *World J Gastroenterol*, 21, 12334-50.
- VAJKOCZY, P., BLUM, S., LAMPARTER, M., MAILHAMMER, R., ERBER, R., ENGELHARDT, B., VESTWEBER, D. & HATZOPOULOS, A. K. 2003. Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med*, 197, 1755-65.
- VASSILOPOULOS, G., WANG, P. R. & RUSSELL, D. W. 2003. Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion. *Nature*, 422, 901-4.
- VOERMANS, C., ROOD, P. M., HORDIJK, P. L., GERRITSEN, W. R. & VAN DER SCHOOT, C. E. 2000. Adhesion molecules involved in transendothelial migration of human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells*, 18, 435-43.
- WANG, X., WILLENBRING, H., AKKARI, Y., TORIMARU, Y., FOSTER, M., AL-DHALIMY, M., LAGASSE, E., FINEGOLD, M., OLSON, S. & GROMPE, M. 2003a. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422, 897-901.
- WANG, Y., SU, X., SORENSON, C. M. & SHEIBANI, N. 2003b. Tissue-specific distributions of alternatively spliced human PECAM-1 isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 284, H1008-17.
- WOODFIN, A., VOISIN, M. B. & NOURSHARGH, S. 2007. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 2514-23.

- YIN, A. H., MIRAGLIA, S., ZANJANI, E. D., ALMEIDA-PORADA, G., OGAWA, M., LEARY, A. G., OLWEUS, J., KEARNEY, J. & BUCK, D. W. 1997. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 90, 5002-12.
- YONG, K. L., WATTS, M., SHAUN THOMAS, N., SULLIVAN, A., INGS, S. & LINCH, D. C. 1998. Transmigration of CD34+ cells across specialized and nonspecialized endothelium requires prior activation by growth factors and is mediated by PECAM-1 (CD31). *Blood*, 91, 1196-205.
- ZOCCO, M. A., PISCAGLIA, A. C., GIULIANTE, F., ARENA, V., NOVI, M., RINNINELLA, E., TORTORA, A., RUMI, C., NUZZO, G., VECCHIO, F. M., BOMBARDIERI, G. & GASBARRINI, A. 2011. CD133+ stem cell mobilization after partial hepatectomy depends on resection extent and underlying disease. *Dig Liver Dis*, 43, 147-54.
- ZUCHTRIEGEL, G., UHL, B., PUHR-WESTERHEIDE, D., PÖRNBACHER, M., LAUBER, K., KROMBACH, F. & REICHEL, C. A. 2016. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol*, 14, e1002459.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Professor Dr. Schulte am Esch für die Bereitstellung des Themas, seine durchgehende Unterstützung und seine konstruktiven Anregungen und Ratschläge. Seine Begeisterung für dieses Projekt war mitreißend und motivierend.

Frau Dr. Constanze Duhme danke ich für ihre fachliche und methodische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Maria Wecker. Mit Ihrer Unterstützung und Herzlichkeit hat sie einen großen Beitrag zum Gelingen der Arbeit geleistet.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie von Herzen danken. Insbesondere meinem Mann und meinen Eltern. Ohne ihre Unterstützung, ihre Motivation und Hilfe bei der Kinderbetreuung wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nur schwer möglich gewesen.