

Zentrum für Innere Medizin
III. Medizinische Klinik und Poliklinik
des Universitätsklinikums Hamburg - Eppendorf

Direktor
Prof. Dr. med. Rolf Stahl

**Regeneration glomerulärer Endothelzellen
durch Zellen aus dem Knochenmark:
Infiltration EGFP⁺- Zellen nach Induktion
einer Endothelzell-Nephritis**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Martina Brinkmeyer
aus
Wuppertal

Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 25.06.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. F. Thaiss

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Heinzer

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. M. Kemper

Teile dieser Dissertation wurden bereits vorgestellt auf dem

Deutschen Kongress für Nephrologie 2008

39. Kongress
der Gesellschaft für Nephrologie (GfN)

41. Jahrestagung
der Deutschen Arbeitsgemeinschaft
für Klinische Nephrologie (DAGKN)

vom 27. bis 30. September in Tübingen

Mögliche Bedeutung von Zellen aus dem Knochenmark bei Induktion und Resolution einer experimentellen anti- Endothelzell-Nephritis (Freier Vortrag)

(Bone marrow derived cells contribute to both glomerular inflammatory cell and
endothelial progenitor cell infiltration in a rat model of renal endothelial
microvascular injury (REMI))

C. Meyer-Schwesinger *; M. Brinkmeyer *; J. U. Becker¹; G. Zahner; C. Lange²;
A. Raabe²; U. Helmchen³; R. A. K. Stahl; F. Thaiss

Abteilung für Nephrologie/Osteologie, III. Medizinische Klinik,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg; ¹ Institut für Pathologie,
Medizinische Hochschule Hannover, Hannover; ² Campus Forschung, ³
Nierenregister, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Hamburg

* contributed equally

Teile dieser Dissertation wurden als Poster-Präsentation vorgestellt bei der

Renal Week 2008

der

American Society of Nephrology (ASN)

vom 04. bis 09. November 2008 in Philadelphia, USA

Bone marrow derived cells contribute to both glomerular
inflammatory cell and endothelial progenitor cell infiltration
in a rat model of renal endothelial microvascular injury
(REMI)

C. Meyer-Schwesinger *; M. Brinkmeyer *; J. U. Becker¹; G. Zahner; C. Lange²;
A. Raabe²; U. Helmchen³; R. A. K. Stahl; F. Thaiss
Abteilung für Nephrologie/Osteologie, III. Medizinische Klinik,
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg; ¹ Institut für Pathologie,
Medizinische Hochschule Hannover, Hannover; ² Campus Forschung, ³
Nierenregister, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Hamburg

* contributed equally

Meinen Eltern gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	III
1	Einleitung	1
1.1	Nierenerkrankungen: Ursachen und Therapieoptionen	1
1.2	Stammzellen	2
1.2.1	Diversität von Stammzellen	2
1.2.2	Die Stammzellen des Knochenmarks	3
1.2.3	‘Plastizität‘ von Stammzellen	4
1.2.4	Stammzelltherapien im Tiermodell und am Menschen	5
1.3	Das Endothel	6
1.3.1	Funktionen des Endothels und Endothelzelltypen in der Niere	6
1.3.2	Die Rolle des Endothels bei Nierenerkrankungen	7
1.4	Krankheitsmodelle des Endothelzellschadens	7
1.4.1	Das REMI-Modell dieser Promotionsarbeit	7
1.4.2	Tiermodelle des Endothelzellschadens	8
2	Fragestellung der Arbeit	12
2.1	Organisation der Arbeit	13
3	Material	14
3.1	Antikörper	14
3.1.1	Primärantikörper	14
3.1.2	Sekundärantikörper	14
3.2	Chemikalien und Reagenzien	15
3.3	Puffer und Lösungen	16
3.4	Geräte und Instrumente	18
4	Methoden	21
4.1	Versuchstiere	21
4.1.1	Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)	21
4.1.2	Tierhaltung	22
4.2	Knochenmarksisolation aus EGFP-transgenen Wistarratten	22
4.3	Knochenmarksdepletion durch Ganzkörperbestrahlung	23
4.4	Knochenmarkstransplantation in Wistarratten	23

4.5	Nachweis der erfolgreichen Knochenmarkstransplantation	24
4.5.1	Blutausstriche.....	24
4.5.2	FACS-Analysen.....	24
4.6	Das REMI-Modell mit EGFP als Zelllinienmarker	25
4.6.1	Versuchsablauf	26
4.6.2	Herstellung des anti-Endothelzell-Antikörpers.....	27
4.6.3	Uninephrektomie und Induktion von REMI	27
4.6.4	Organentnahme und Probenverarbeitung	28
4.6.4.1	Serumzentrifugation	29
4.6.4.2	Formalینگewebe	29
4.6.4.3	Sucrosegewebe.....	30
4.7	Histologie	31
4.7.1	Allgemeines.....	31
4.7.2	Gefrierschnitte.....	31
4.7.2.1	ToPro 3-Färbung	32
4.7.2.2	ED-1-Färbung und Reca-1-Färbung	32
4.7.3	Paraffinschnitte	33
4.7.3.1	Kaninchen-IgG-Färbung.....	33
4.7.3.2	PAS-Färbung.....	34
4.7.3.3	Doppelfärbung PCNA und EGFP	35
4.8	Mikroskopie	36
4.8.1	Lichtmikroskopie	36
4.8.2	Fluoreszenzmikroskopie	37
4.8.3	Konfokale Mikroskopie.....	37
4.8.3.1	Quantifizierung und Ko-Lokalisationsuntersuchungen.....	38
5	Ergebnisse.....	41
5.1	Die Knochenmarkstransplantation war erfolgreich.....	41
5.1.1	Blutausstriche zeigen Chimärismus.....	41
5.1.2	FACS-Analysen bestätigen die Ergebnisse der Blutausstriche	41
5.2	REMI-Tiere werden krank und der Nierenschaden heilt nicht aus	42
5.2.1	Die PAS-Färbung zeigt die durch REMI induzierten Schäden	42
5.2.2	Kaninchen-IgG hat an die Endothelzellen der Ratte gebunden	45
5.3	Serum–Analysen bestätigen die Nierenschädigung	46
5.4	Knochenmarkszellen wandern in die Niere von REMI-Tiere ein	47
5.5	Die Proliferationsrate bei REMI-Tieren ist gesteigert	50

5.6	Die Mehrzahl der einwandernden Knochenmarkszellen sind Makrophagen	52
5.7	Ein Endothelzellersatz findet in geringem Maße statt	56
6	Diskussion der Ergebnisse	62
7	Zusammenfassung	76
II.	Literaturverzeichnis	77
III.	Curriculum vitae	85
IV.	Danksagung	86
V.	Anhang	87

1 Einleitung

1.1 *Nierenerkrankungen: Ursachen und Therapieoptionen*

Eine chronische Nephropathie verläuft häufig progredient und endet, unabhängig vom initialen Auslöser, in der terminalen Niereninsuffizienz (Remuzzi et al. 2006). Trotz erster erfolgreicher Dialysebehandlung eines akuten Nierenversagens bereits im Jahr 1945 (Goldmann 2008) und erster erfolgreicher Nierentransplantation bei eineiigen Zwillingen im Jahr 1954 (Groß 2002), stellt die terminale Niereninsuffizienz noch immer eine ernstzunehmende Erkrankung dar, die die Lebensqualität und Lebenserwartung von Patienten einschränkt. Die mit Abstand häufigste Ursache ist die diabetische Nephropathie, weitere Ursachen sind Glomerulonephritiden und Hypertonus (Kuhlmann et al. 2003). Die Therapieoptionen einer terminalen Niereninsuffizienz sind begrenzt und erfordern häufig die Durchführung einer Dialysebehandlung bis zur Nierentransplantation (Remuzzi et al. 2006). Dieser Weg ist aufgrund des Organmangels jedoch lang. Derzeit beträgt die Wartezeit in Deutschland im Mittel fünf Jahre (Deutsche Stiftung Organtransplantation 2008). Die nach Nierentransplantation heute erreichten Überlebensraten von bis zu 95 % ein Jahr nach verwandter Lebendspende und Organfunktionsraten von 90 - 70 % nach drei bis fünf Jahren (Eurotransplant 2008) bedeuten einen großen Fortschritt. Jedoch dürfen die physischen und psychischen Auswirkungen der Transplantation und lebenslangen immunsuppressiven Therapie nicht unterschätzt werden.

Daher wird nach alternativen Therapien geforscht, die schnell verfügbar und risikoärmer sind und der progredienten Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz entgegenwirken. Stammzellen sind aus diesem Grund auch auf dem Gebiet der Nephrologie vermehrt ins Zentrum des Interesses gerückt. Ob Stammzellen jedoch zur Regeneration zerstörter Organstrukturen der Niere beitragen und eine Alternative zu herkömmlichen Therapien darstellen können, ist derzeit noch Gegenstand intensiver Forschung (Fischbach et al. 2004).

1.2 Stammzellen

1.2.1 Diversität von Stammzellen

Eine Stammzelle hat zwei entscheidende Eigenschaften: Erstens ist sie zu unendlicher, symmetrischer Zellteilung fähig, die zwei identische Tochterzellen hervorbringt. Zweitens ist eine asymmetrische Zellteilung möglich, bei der eine Tochterzelle der Elternzelle identisch, die andere in ihrer proliferativen Fähigkeit beschränkt und in ihrer Zelllinienentwicklung determinierter ist. Diese Zelle wird später 'Progenitorzelle' oder 'Precursorzelle' genannt und kann nur noch entlang weniger Zelllinien differenzieren. Die Differenzierungsfähigkeit, das Potential einer Stammzelle, hängt somit entscheidend von ihrer Entwicklungsstufe ab: Grundsätzlich lassen sich embryonale Stammzellen, Nabelblutstammzellen und adulte Stammzellen voneinander unterscheiden (Haas et Kronenwett 2005). Gegenstand heutiger Forschung sind vor allem embryonale und adulte Stammzellen.

Embryonale Stammzellen können aus der inneren Zellschicht der Blastula, dem vier bis fünf Tage alten Embryo, isoliert werden. Sie sind pluripotent, da sie sich in alle menschlichen Zellen und Gewebe, bis auf extraembryonale Strukturen, wie die Plazenta, differenzieren können (Fischbach et al. 2004). Aufgrund dieser Fähigkeit sind sie für Forschungszwecke besonders interessant. Jedoch gibt es ethische und religiöse Bedenken sowie rechtliche Restriktionen, die in vielen Ländern die gezielte Herstellung und Tötung menschlicher Embryonen für die Forschung verbieten (Fischbach et al. 2004, Hamberger et al. 2005).

Adulte Stammzellen befinden sich beim erwachsenen Menschen vor allem in Knochenmark, Haut, Darm, Leber und Gehirn. Auch in der Bowmannschen Kapsel menschlicher Glomeruli in der Niere konnten solche Stammzellen nachgewiesen werden (Sagrinati et al. 2006). Adulte Stammzellen sind multipotent: Ihre Differenzierungsfähigkeit ist damit, verglichen mit embryonalen Stammzellen, eingeschränkt (Haas et Kronenwett 2005). Aufgrund ihres Alters können sie zudem eine Vielzahl an genetischen Mutationen erworben haben (Fischbach et al. 2004). Die Forschung an diesem Stammzelltyp wurde

dennoch in den letzten Jahren intensiviert, da sich Hinweise auf eine adulte 'Stammzellplastizität' ergaben. Diese kann als Fähigkeit adulter Stammzellen bezeichnet werden, zelllinienübergreifende Eigenschaften auszubilden (s. Kapitel 1.2.3).

1.2.2 Die Stammzellen des Knochenmarks

Adulte Stammzellen aus dem Knochenmark sind aufgrund der leichten Zugänglichkeit und einfachen Gewinnung mittels Knochenmarksisolation für Forschungszwecke besonders geeignet. Auch in dieser Promotionsarbeit wurden Stammzellen aus dem Knochenmark untersucht.

Neben bereits terminal differenzierten Zellen lassen sich zwei wichtige adulte Stammzelltypen im Knochenmark unterscheiden: die hämatopoetischen (HSCs) und die mesenchymalen (MSCs) Stammzellen. HSCs sind Stammzellen der hämatopoetischen Zelllinie und damit der Ursprung aller differenzierten Blutzellen (Poulsom et al. 2003, Haas et Kronenwett 2005). MSCs nehmen bezüglich der Hämatopoese eine Unterstützungsfunktion ein und differenzieren sich unter anderem in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten (Tögel et al. 2005).

Der Ursprung von Endothelzellen, die in dieser Promotionsarbeit von besonderem Interesse sind, wird ebenfalls im Knochenmark vermutet. So wird angenommen, dass Endothelzellen und hämatopoetische Zellen vom Hämangioblasten, einer primitiven, gemeinsamen Stammzelle im Knochenmark, abstammen (Sumpio et al. 2003, Haas et Kronenwett 2005). Auch die Existenz von Zellen mit Koexpression der Oberflächenantigene CD34 (Marker für hämatopoetische Stammzellen) und VEGFR-2 (Vascular endothelial growth factor receptor 2) im Knochenmark legt diesen Schluss nahe, da sich diese Zellen *in vitro* sowohl zu Endothelzellen als auch zu hämatopoetischen Zellen entwickeln können (Haas et Kronenwett 2005, Shi et al. 1998). Neuere Studien konnten phänotypische und funktionelle Ähnlichkeiten zwischen myeloiden Zellpopulationen im Knochenmark und endothelialen Progenitorzellen (EPCs) nachweisen, was die Vermutung unterstützt, beide

Zelllinien könnten verwandt sein (Loomans et al. 2006). Auch eine Mobilisation von Endothelzell-Progenitorzellen aus dem Knochenmark und deren Zirkulation im Blut nach Gewebeschädigung konnte bereits nachgewiesen werden (Haller et al. 2005).

Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll, Stammzellen aus dem Knochenmark in Hinblick auf eine Transdifferenzierung in Endothelzellen nach akuter Schädigung der Niere zu untersuchen.

1.2.3 *'Plastizität' von Stammzellen*

Übernimmt eine adulte Stammzelle funktionelle oder phänotypische Eigenschaften einer fremden Stammzelllinie, so spricht man von 'Plastizität'. Mechanismen, die zur 'Plastizität' beitragen können, beinhalten: Transdifferenzierung, Transdetermination, Zellfusion sowie Dedifferenzierung mit anschließender Differenzierung (Haas et Kronenwett 2005). Die Literatur beschäftigt sich vor allem mit der Transdifferenzierung, bei der terminal differenzierte Zellen funktionelle und phänotypische Eigenschaften anderer terminal differenzierter Zellen annehmen (Haas et Kronenwett 2005). Hinsichtlich Transdifferenzierung ist allerdings zu beachten, dass bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob diese nicht zwangsläufig und regelhaft über ein Stadium von De-Differenzierung mit anschließender Differenzierung verläuft (Koestenbauer et al. 2006) und beide somit keine voneinander getrennten Mechanismen darstellen. Dass Zellfusion eine große Rolle spielen könnte, wird überwiegend kritisch gesehen (Li et al. 2006, Rookmaaker et al. 2003, Poulson et al. 2003, Janus et al. 2003). Obwohl adulte Stammzellen multipotent sind und definitionsgemäß ein begrenztes Repertoire an Differenzierungsmöglichkeiten haben, sollen sie aufgrund dieser 'Plastizität' jedoch in der Lage sein, über Zelliniengrenzen hinweg zur Funktionserhaltung und Regeneration von Geweben beizutragen. Es wurde z.B. in verschiedenen Tiermodellen gezeigt, dass Stammzellen aus dem Knochenmark in Endothelzellen (Rookmaaker et al. 2003), Hepatozyten (Theise et al. 2000), Kardiomyozyten (Orlic et al. 2003) und neuroektodermale Zellen (Brazelton et al. 2000) transdifferenzieren können.

Die Relevanz dieser Stammzellplastizität für die Regeneration nach Organschädigung wird jedoch aufgrund der nicht einheitlichen Studienlage zur Auftretenshäufigkeit dieses Phänomens kontrovers diskutiert (Krause et al. 2005).

1.2.4 Stammzelltherapien im Tiermodell und am Menschen

In den letzten Jahren wurden vermehrt auch Stammzelltherapien zur Resolution von Nierenschäden im Tiermodell erforscht. Nach Induktion der anti-Thy1.1-Glomerulonephritis (s. Kapitel 1.4.2) in Ratten wurden z.B. in einer Studie mononukleäre Knochenmarkszellen, die zuvor mit VEGF (Vascular endothelial growth factor) kultiviert worden waren, intrarenal injiziert. VEGF ist ein Cytokin, das vor allem bei Hypoxie induziert wird und als Wachstumsfaktor für Endothelzellen fungiert (Hohenstein et al. 2007). Nach intrarenaler Injektion dieser mit VEGF kultivierten mononukleären Knochenmarkszellen kam es zu einer Integration dieser Zellen ins Endothel und zu einem mildereren Verlauf der Erkrankung (Uchimura et al. 2005).

Kunter et al. konnten im gleichen Tiermodell nach lokaler Instillation von MSCs ebenso eine schnellere Regeneration der Niere beobachten. Da Transdifferenzierungen jedoch nur in sehr geringer Zahl nachgewiesen werden konnten, vermuteten sie, parakrine Effekte der MSCs seien dafür verantwortlich (Kunter et al. 2006).

Klinische Studien zur Stammzelltherapie beim Menschen gibt es bereits mit teils guten Erfolgen vor allem in der Kardiologie (Tögel et al. 2007). Dabei werden sowohl Wachstumsfaktoren wie G-CSF erprobt, die eine Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark ins Blut bewirken (Ince et al. 2005, Zohlnhöfer et al. 2006), als auch die direkte Injektion von Knochenmarkszellen (Wollert et al. 2004) und die Infusion von MSCs (Chen et al. 2004). Klinische Studien zur Stammzelltherapie bei humanen Nierenerkrankungen gibt es bisher nicht.

In der vorliegenden Promotionsarbeit soll es, neben der Untersuchung einer Infiltration von Knochenmarkszellen in die Niere, vor allem um die Frage nach einem glomerulären Endothelzellersatz durch Stammzellen aus dem Knochenmark gehen (s. Kapitel 2 'Fragestellung der Arbeit'). Aus diesem Grund liegt der Fokus der folgenden Kapitel der Einleitung auf dem Endothel.

1.3 Das Endothel

1.3.1 Funktionen des Endothels und Endothelzelltypen in der Niere

Endothelzellen bilden die innere Zellschicht von Blutgefäßen. Hauptsächliche Aufgaben von Endothelzellen sind neben dem Stoffaustausch die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, vor allem über Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin, die Ultrafiltration des Blutes bei der Harnbildung, eine Antithrombose, vermittelt über Plasminogenaktivator (t-PA) und über die Glykokalyx, die Bildung prothrombotischer Faktoren sowie eine Entzündungs- und Zellwachstumsregulation (Welsch 2003).

In der Niere lassen sich präglomeruläre, glomeruläre, postglomeruläre und peritubuläre Endothelzellen unterscheiden, die nicht identisch sind (Aird 2007). So ist z.B. glomeruläres Endothel diskontinuierlich mit offenen Poren, peritubuläres Endothel besitzt ein Porendiaphragma und ist somit fenestriert (Welsch 2003, Stan et al. 1999). Präglomeruläre Konnexine, die Baueinheiten von Gap junctions, unterscheiden sich in ihrem Verteilungsmuster von postglomerulären Konnexinen (Zhang et al. 2005). Glomeruläre und peritubuläre Endothelzellen zeigen nach Schädigung Unterschiede im Zytokinmuster, was zur Rekrutierung unterschiedlicher Typen von Entzündungszellen führt (Panzer et al. 2006).

Im Fokus unserer Untersuchungen stand glomeruläres Endothel.

1.3.2 Die Rolle des Endothels bei Nierenerkrankungen

Das Blutgefäßsystem spielt eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Nierenfunktion. Eine Dysfunktion des Endothels wird als Schlüsselereignis bei der Ausbildung eines akuten und chronischen Nierenversagens angesehen (Segal et al. 2006). Mögliche Gründe für die zentrale Rolle des Endothels beim Fortschreiten einer Nierenerkrankung sind die Produktion von Stoffen, die ein proinflammatorisches Umgebungsklima schaffen, das Ablösen von Endothelzellen sowie eine Kapillaratrophie mit ungenügender Sauerstoffversorgung (Segal et al. 2006). In einer Studie zum normalen Alterungsprozess konnte diese Verbindung zwischen dem Verlust an glomerulärem und peritubulärem Endothel und der Entwicklung einer Nephropathie gezeigt werden (Kang et al. 2001). Auch in einer Studie zur akuten Transplantatabstoßung spielte die Endothelzellablösung eine Rolle: Bei Patienten mit manifester Abstoßungsreaktion wurde eine sehr viel höhere Anzahl maturer Endothelzellen im Blutkreislauf festgestellt als bei Patienten ohne eine solche Abstoßungsreaktion (Woywodt et al. 2003).

Krankheiten mit prognosebestimmender Nierenbeteiligung, die auf einer Dysfunktion oder Schädigung des Endothels beruhen, sind z.B. das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), der Diabetis mellitus, die Vaskulitiden, die Schwangerschaftsgestose und die Transplantatabstoßung (Hohenstein et al. 2007, Kuhlmann et al. 2003). Da die Regenerationsfähigkeit der Niere verglichen mit Darmschleimhaut, Knochenmark und Haut gering ist, kommt es häufig zu einer die Funktion stark beeinträchtigten Defektheilung (Tögel et al. 2007).

1.4 Krankheitsmodelle des Endothelzellschadens

1.4.1 Das REMI-Modell dieser Promotionsarbeit

Das in dieser Promotionsarbeit verwendete REMI-Modell (**R**enal **E**ndothelial **M**icrovascular **I**njury) der Ratte (s. Kapitel 4.6), stellt das Modell einer thrombotischen Mikroangiopathie dar. Es ist ein modifiziertes Modell des

ursprünglich 1997 von der Arbeitsgruppe um Rick Johnson und William Couser etablierten und charakterisierten REMI-Modells (Nangaku et al. 1997). Zur Verfolgung von Knochenmarkszellen im Verlauf der REMI-Erkrankung diente EGFP (**E**nhanced **G**reen **F**luorescent **P**rotein, s. Kapitel 4.1.1). Dazu wurde Wistarratten das Knochenmark von EGFP-transgenen Wistaratten transplantiert. Nach Uninephrektomie (Entnahme einer Niere) erfolgte die Induktion von REMI durch selektive Perfusion der linken Nierenarterie mit einem anti-Endothelzell-Antikörper. Konsekutiv kam es zu einer akuten Funktionsverschlechterung der Niere, zur Bildung von Fibrinthromben, Endothelzellschwellung und -verlust, Tubulusatrophie sowie zur Einwanderung von Entzündungszellen. Das REMI-Modell wurde verwendet, da es spezifisch einen Endothelzellschaden verursacht. Durch die EGFP-Markierung konnte im Verlauf der Erkrankung die Infiltration von Knochenmarkszellen in die Niere und eine eventuelle Transdifferenzierung von darin enthaltenen Stammzellen in Endothelzellen untersucht werden.

1.4.2 Tiermodelle des Endothelzellschadens

In der Literatur finden sich wenige tierexperimentelle Studien mit Induktion eines spezifischen Endothelzellschadens. Auch war in den vorhandenen Studien die Rolle des Knochenmarks im Verlauf der Erkrankung nicht Gegenstand der Untersuchung. Im Folgenden sollen daher zunächst Tiermodelle vorgestellt werden, die zwar spezifisch das Endothel schädigen, die Rolle des Knochenmarks im Verlauf der Erkrankung jedoch nicht beleuchten. Im Anschluss daran werden Tiermodelle vorgestellt, die die Rolle von Knochenmarkszellen in Modellen mit sekundärem Endothelzellschaden untersuchen.

Ein Modell des primären Endothelzellschadens ist das REMI-Modell der Ratte von der Arbeitsgruppe um Rick Johnson und William Couser (Nangaku et al. 1997), das in dieser Promotionsarbeit in modifizierter Form zur Anwendung kam. Zur Induktion des glomerulären Endothelzellschadens in Wistarratten wurde ein polyklonaler Ziegen-Antikörper gegen glomeruläre Ratten-

Endothelzellen hergestellt. Die selektive Perfusion der rechten Niere mit diesem Antikörper erfolgte über die Arteria mesenterica superior. Anschließend wurde die nicht-perfundierte, linke Niere entnommen. Als Reaktion kam es zur Entwicklung einer thrombotischen Mikroangiopathie mit Ausbildung eines akuten Nierenversagens, glomerulärer und peritubulärer Endothelzellschädigung, Leukozyteninfiltration, Fibrinablagerung, Thrombozytenaggregation, Tubulusnekrosen und Fibrosierung. Endothelzellen wurden in diesem Modell, wie auch in dem in dieser Promotionsarbeit verwendeten REMI-Modell, mittels Färbung von Reca-1 detektiert. Im Beobachtungszeitraum von zehn Tagen kam es zu einer partiellen Resolution der Nierenschädigung.

Es existieren weiterhin Immunkomplex-Modelle, die zu einer spezifischen Endothelzellschädigung führen. Diese wird dabei durch selektive Perfusion der linken Nierenarterie mit dem Lectin Concanavalin A (Con A), das an Endothelzellen bindet, und nachfolgende Perfusion mit einem Antikörper gegen Con A hervorgerufen und betrifft glomeruläre und peritubuläre Kapillaren gleichermaßen. Das ursprüngliche Modell wurde von Golbus und Wilson in Ratten etabliert (Golbus et Wilson 1979). In einem modifizierten Modell von Johnson et al. wurde bei den Ratten vor Induktion der Erkrankung eine Uninephrektomie durchgeführt (Johnson et al. 1988). Beide Autoren fokussierten sich vor allem auf die Rolle von Thrombozyten und Neutrophilen im Verlauf der Erkrankung.

Die neueste Modifikation des Modells wurde kürzlich von Hohenstein et al. in der Maus etabliert (Hohenstein et al. 2007). Es ist für unsere Untersuchungen vor allem deshalb interessant, da die Autoren auch die Infiltration von Makrophagen, Proliferationsraten und das Schicksal von Endothelzellen untersuchen. Eine Uninephrektomie der nicht-perfundierten Niere wurde bei Hohenstein et al. nicht durchgeführt. Im Verlauf der Erkrankung kam es zur Ausbildung einer thrombotischen Mikroangiopathie mit Endothelzelluntergang, glomerulären und peritubulären Thromben, Leukozyteninfiltration und

Tubulusnekrosen. Kapillaren wurden in diesem Modell mittels Färbung von CD31 und Lectin detektiert. Im Beobachtungszeitraum von sieben Tagen kam es nicht zur vollständigen Resolution der Nierenschäden.

Bei fast allen experimentellen Nierenerkrankungen kommt es sekundär zu einem Endothelzellschaden (Hohenstein et al. 2007). Aus diesem Grund sollen im Folgenden auch Modelle beschrieben werden, die zwar nur sekundär das Endothel schädigen, bei denen jedoch die Rolle des Knochenmarks im Verlauf der Erkrankung untersucht wurde.

Ein häufig verwendetes Modell ist das ATM-Modell (**anti-Thy1.1-Modell**) der Ratte. Hierbei kommt es durch Injektion eines monoklonalen Antikörpers gegen Thy1.1, einem Oberflächenantigen auf Ratten-Mesangialzellen, zur Ausbildung einer reversiblen mesangialen und sekundär endothelialen Glomerulonephritis.

Ito et al. induzierten das ATM-Modell in Sprague-Dawley Ratten, denen zuvor - analog zu unserer Studie - EGFP-positives (EGFP⁺) Knochenmark transplantiert worden war. Dadurch konnten sie Knochenmarkszellen im Verlauf der Erkrankung verfolgen. Eine Uninephrektomie wurde nicht durchgeführt. Nach vier Wochen kam es zur Ausheilung des Nierenschadens. Ito et al. konnten keine Transdifferenzierungen von EGFP⁺-Zellen in Endothelzellen, die sie mittels Reca-1 und Faktor VII gefärbt hatten, feststellen (Ito et al. 2001).

Bei Rookmaaker et al. diente nach Knochenmarkstransplantation ein für Wistarratten spezifischer MHC-I-Komplex als Nachweis von Knochenmarkszellen. Reca-1 wurde verwendet, um Endothelzellen zu detektieren. Nach Induktion des reversiblen ATM-Modells wiesen die Autoren eine Transdifferenzierung von Knochenmarkszellen in Endothelzellen in geringem Maße nach (Rookmaaker et al. 2003).

Ikarashi et al. induzierten eine progressive Form der anti-Thy1.1-Glomerulonephritis in Sprague-Dawley Ratten. Hier kam es nicht zur Ausheilung der Erkrankung. Kurz nach Injektion von anti-Thy1.1 wurden die Ratten uninephrektomiert. Ikarashi et al. konnten Transdifferenzierungen von

EGFP⁺-Knochenmarkszellen in Endothelzellen, die mit Recla-1, PECAM-1 und vWF gefärbt wurden, nachweisen (Ikarashi et al. 2005).

Im Ischämie/Reperusionsmodell (I/R-Modell) der Maus kommt es primär zur Schädigung des Tubulusepithels mit Verlust des Bürstensaums und Tubulusnekrosen durch 30-45-minütige Unterbrechung der Nierendurchblutung. Jedoch führt die Ischämie ebenfalls zu einem Endothelschaden. In Mäusen, denen EGFP⁺-Knochenmark transplantiert worden war, konnten Duffield et al. sieben Tage nach Induktion des I/R-Schadens eine geringe Anzahl an Transdifferenzierungen von EGFP⁺-Knochenmarkszellen in Endothelzellen in peritubulären, nicht aber in glomerulären Kapillaren finden. Endothelzellen wurden mittels Färbung von vWF (von Wille-Brandt-Faktor) und CD31 detektiert (Duffield et al. 2005).

In anderen Organen konnten Studien einen Endothelzellersatz durch Knochenmarksstammzellen z.B. am Herzen (Goodell et al. 2001, Orlic et al. 2001) und Pankreas (Mathews et al. 2004) nachweisen.

2 Fragestellung der Arbeit

Trotz großer experimenteller und klinischer Fortschritte in der Therapie von entzündlichen, glomerulären Nierenerkrankungen, kommt es bei Glomerulonephritiden meist nicht zum vollständigen Ausheilen des Nierenschadens sondern nur zu einer Defektheilung.

Auf der Suche nach Möglichkeiten, eine Restitutio ad integrum zu erreichen, ist die Stammzelltherapie auch auf dem Gebiet der Nephrologie vermehrt ins Zentrum des Interesses gerückt. Das unmittelbare Ziel dieser Promotionsarbeit ist es daher, in einem Modell der akuten Endothelzellschädigung der Niere (**R**enal **E**ndothelial **M**icrovascular **I**njury = REMI-Modell), zu untersuchen, ob es zur Infiltration von Knochenmarkszellen in die Niere kommt und ob diese an der Regeneration des Endothels nach akutem Schaden beteiligt sind. Ein Nierenschaden, der sich wie beim REMI-Modell vorwiegend an Gefäßendothelien abspielt, ist klinisch z.B. beim hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS), dem Diabetis mellitus, den Vaskulitiden, der Schwangerschaftsgestose und der Transplantatabstoßung von pathogenetischer Bedeutung.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Findet eine Infiltration von Knochenmarkszellen in die Niere statt?
- Bestehen Unterschiede in der Anzahl infiltrierender Knochenmarkszellen zwischen gesunden und kranken Tieren?
- Gibt es Peaks in der Zelleinwanderung und wann treten sie auf?
- Wie hoch ist der Anteil von Makrophagen an den infiltrierenden Knochenmarkszellen?
- Transdifferenzieren sich im Knochenmark enthaltene Stammzellen in Endothelzellen und kommt es zur Integration dieser in Endothelzellen transdifferenzierten Stammzellen in die glomeruläre Struktur?

2.1 Organisation der Arbeit

Im Kapitel 3 'Material' erfolgt eine Auflistung der zur Durchführung der Studie benötigten Materialien. Im Kapitel 4 'Methoden' werden Voraussetzungen, Aufbau und Durchführung der Versuche sowie die weiterführende Verarbeitung der Gewebeproben vorgestellt. Hieran schließt sich im Kapitel 5 die Darstellung aller gewonnenen Ergebnisse an. Im Kapitel 6 'Diskussion der Ergebnisse' werden die Ergebnisse in Beziehung zum gegenwärtigen Stand der Forschung gesetzt. Nach der Zusammenfassung im Kapitel 7 folgt das Literaturverzeichnis und der Anhang mit Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis sowie der eidesstattlichen Versicherung und dem Nachweis der zitierten Internetseiten.

3 Material

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der verwendeten Materialien.

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Marker für	Antikörper	Klon	Verdünnung	Konzentration	Hersteller
Makrophagen	Maus anti-Ratte CD68, IgG 1, monoklonal	ED1	1:100	0,5 mg/ ml	Serotec
Endothelzellen	Maus anti-Ratte Reca-1, IgG 1, monoklonal	HIS52	1:400	0,5 mg/ ml	Serotec
EGFP	Kaninchen anti- GFP, IgG, polyklonal	-	1:50	200 µg/ ml	SantaCruz
Proliferation	Maus anti-PCNA, IgG 2, monoklonal	P10	1:50	100 µg/ ml	Oncogene Research Products

3.1.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Konzentration	Hersteller
Cy3 Esel anti-Maus IgG	1:200 / 1:600	1,4 mg/ ml	Jackson Immuno Research
Cy3 Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	1,4 mg/ ml	Jackson Immuno Research
Cy2 Esel anti-Kaninchen IgG	1:200	1,5 mg/ ml	Jackson Immuno Research

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, BRD
DMEM mit 450 mg/ dl Glucose	Gibco-BRL, Gaithersburg, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma, Steinheim, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol 100 %, 96 %	Walter CMP, Kiel, BRD
Ethanol 99 % (mit 1 % Methylethylketon vergällt)	Walter CMP, Kiel, BRD
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg, BRD
Fluoromount G	Southern Biotech, Biozol, USA
Formaldehyd 37 % (stabilisiert)	Merck, Darmstadt, BRD
Hämatoxylin	Serva, Heidelberg, BRD
Hunter Titer Max Gold	Sigma, Steinheim, BRD
Salzsäure 25 %	Merck, Darmstadt, BRD
IMDM mit L-Glutamin und 25 ml HEPES	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe, BRD
Isofluran	J.T. Baxter, Deventer, Holland
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Steinheim, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Fluka, Steinheim, BRD
Natrium-Iodat	Merck, Darmstadt, BRD
Natrium-Cacodylat	Fluka, Steinheim, BRD
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumcitrat-dihydrat	Merck, Darmstadt, BRD
Natrium-dihydrogenphosphat-1-hydrat	Fluka, Steinheim, BRD
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, BRD
Normal Horse Serum	Vector Labs, Burlingame, USA
Pap Cytomation Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Paraformaldehyd 16 % solution	Science Services, München, BRD
Perjodsäure	Merck, Darmstadt, BRD
pH-Kalibrierlösungen (pH 4,1/ 7,0/ 10,0)	WTW, Weilheim, BRD
Proteinase K	Sigma, Steinheim, BRD
Schiffsches Reagenz	Sigma, Steinheim, BRD
Sucrose	Serva, Heidelberg, BRD
Tissue Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek, CA, USA

ToPro 3	Molecular Probes, Leiden, Holland
Triton-X-100	Sigma, Steinheim, BRD
Xylol	J.T. Baxter, Deventer, Holland

3.3 Puffer und Lösungen

Cacodylat-Puffer pH ~7,4

21,4 g Natrium-Cacodylat,
1000 ml Aqua bidest
Mit 0,1N HCL auf pH 7,4 einstellen
Bei 4°C lagern.

Cacodylatpuffer mit Sucrose

500 ml Cacodylatpuffer,
34,23 g Sucrose
Bei 4°C lagern.

Citronensäurepuffer pH ~ 6,1

2,35 g Natriumcitrat,
0.31 g Citronensäure-Monohydrat,
1000 ml Aqua dest.
Puffer gut mischen und einen Tag bei 4°C lösen las sen.
Gegebenfalls pH-Wert mit 5M NaOH auf pH 6,1 hochtitrieren.

4 % gepufferte Formalin-Lösung

320 ml Sörensenphosphatpuffer,
40 ml Formalin 37 % (stabilisiert)
Dunkel bei 4°C lagern.

Hämalaun nach Böhmer

Lösung 1:
10 g Aluminiumkaliumsulfat x 12 H₂O
0,1 g Natrium-Iodat
200 ml Aqua bidest

Über Nacht lösen lassen.

Lösung 2:

0,5 – 1,0 g Hämatoxylin,

10 g Ethanol 100 %

Über Nacht lösen lassen.

Nach dem Mischen beider Lösungen ist der Farbstoff gebrauchsfertig.

HCL-Alkohol

1 ml HCL 25 %,

100 ml Ethanol vergällt

Perfusionslösung

25 ml Paraformaldehyd 16 %,

10 ml Sucrose 40 %,

65 ml PBS

Endkonzentrationen: 4 % Paraformaldehyd, 4 % Sucrose

Immer kurz vor Gebrauch frisch ansetzen.

1:20 normales Pferdeserum in PBS

1 ml normales Pferdeserum 100 %

19 ml PBS

Phosphate Buffered Saline (PBS), pH ~ 7,3

8 g Natriumchlorid,

0,2 g Kaliumchlorid,

0,2 g Kaliumdihydrogenphosphat,

0,765 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂O

1000 ml Aqua dest.

Proteinase K

Stammlösung:

100 mg Proteinase K,

5 ml Aqua dest.

Inkubation der Stammlösung 30 Minuten bis zwei Stunden bei 37° C um DNAsen zu zerstören. Anschließende Alliquotierung und Lagerung bei –20° C. Kurz vor Gebrauch Alliquots mit Stammlösung auftauen und 1:1000 in PBS verdünnen.

Sörensen-Phosphat-Puffer pH ~7,4

3,029 g Natriumhydrogenphosphat-1-hydrat,
14,1365 g Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat,
mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen
Bei 4° C lagern.

30 % Sucrose

30 Sucrose,
mit PBS auf 100 ml auffüllen

40 % Sucrose

Stammlösung:
40g Sucrose,
mit PBS auf 100 ml auffüllen
Vor Gebrauch für Perfusionlösung 1:10 mit PBS verdünnen.

3.4 Geräte und Instrumente

Amiconsäule		Millipore
Automatische Pipettierhilfe	Accujet ➤ Pipettenspitzen (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Brand Falcon
Bestrahlungsröhre	Isovolt DS1	Seifert
Citadelle	Shandon Citadel 1000	Thermo Electron Corporation
Deckgläschen	32mm, 48mm, 60mm	Marienfeld
Dewargefäß		Nalgene
Durchflusszytometer	FacScan	Becton Dickinson

Eppendorf Reaktionsgefäße	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Reagiergefäß 1,5ml SafeSeal ➤ Reagiergefäß 2ml SafeSeal 	Sarstedt Sarstedt
Falconröhrchen	Cellstar (15ml, 50ml)	Greiner bio-one
Fluoreszenzmikroskop	<p>Axioskop 20</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Objektive: Plan- Neofluar (2,5x/ 10x/ 20x/ 40x/ 100x) ➤ Okular: 10x ➤ Camera: Axio Cam HRc ➤ Filter: <ul style="list-style-type: none"> - Filtersatz 09: Exc/ Emis: 450-490/ 515 (FITC, GFP) - Filtersatz 15: Exc/ Emis: 546/ 590 (TRITC/ Cy3) 	Zeiss
Fusselreie Tücher	Kimwipes	Kimberly Clark
Gefriermikrotom	HM 505 E	Microm
Gießstation	Tissue-Tek TEC	Sakura
Große Zentrifuge	Biofuge primo R	Heraeus
Handschuhe	Peha-soft powderfree	Hartmann
Kleine Zentrifuge	MiniSpin	Eppendorf
Konfokales Mikroskop	<p>Laser Scanning Microscope 510 meta</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Objektiv: Plan-Apochromat 63x oil ➤ Okular: 10x ➤ Camera: Axio Cam HRc ➤ Argon-Laser Exc.: 488 nm ➤ HeNe-Laser 1 Exc.: 543 nm ➤ HeNe-Laser 2 Exc.: 633 nm 	Zeiss
Mikrotom	<p>RM 2255</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Wasserbad 1052 	Leica GFL
Mikrowelle	800 W	Severin
Objektträger	<ul style="list-style-type: none"> ➤ SuperFrost Plus ➤ Mit Mattrand ➤ Ohne Mattrand 	Assistent Engelbrecht Marienfeld
Ofen	Typ T12	Kendro

Petrischale	Cellstar	Greiner bio-one
pH-Meter	InoLab	WTW
Pipetten	Pipetman (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl) ➤ Pipettenspitzen (20µl, 200µl, 1000µl) ➤ Pipettenspitzen (10µl)	Gilson Sarstedt Biozym
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	SBA 41, max. 410g, d= 0,001g	Scaltec
Wasserbad		Memmert
Zellsiebe	70 µm	BD Bioscience

4 Methoden

Alle Tierversuche wurden im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Zustimmung der örtlichen Behörden durchgeführt. Die Tierversuchsgenehmigung Nr. 44/04 lag vor.

4.1 Versuchstiere

Männliche, hemizygote, EGFP-transgene Wistarratten von Dr. Eiji Kabayashi (Japan) dienten als Knochenmarksspender für nicht-EGFP-transgene Wistarratten von Charles River Wiga (Sulzfeld, BRD).

Die EGFP-transgenen Wistarratten exprimierten das fluoreszierende Protein EGFP cytoplasmatisch in allen Zellen des Knochenmarks und fast allen Körperzellen (Hakamata et al. 2001, s. Kapitel 4.1.1). Bei Knochenmarkspende waren sie ca. 8 - 14 Wochen alt. Sie starben bei der Spende.

Die nicht-EGFP-transgenen Wistarratten, die als Knochenmarksempfänger dienten, waren zum Zeitpunkt der Knochenmarkstransplantation ca. 50 - 80 g schwer und 4 - 6 Wochen alt. Im Alter von ca. 12 - 16 Wochen und einem Gewicht von ca. 200 g wurden diese Tiere uninephrektomiert und bei einem Teil der Tiere die REMI-Erkrankung induziert (s. Kapitel 4.6.3).

4.1.1 *Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)**

EGFP ist ein Protein, das bei optischer Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm grünes Licht emittiert und auf diese Weise bei histologischen Gewebsuntersuchungen leicht detektiert werden kann.

* Für die Entdeckung und Weiterentwicklung von GFP wurde der Nobelpreis für Chemie 2008 an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien verliehen (Nobel Foundation 2008)

Das in dieser Promotionsarbeit verwendete EGFP wird cytoplasmatisch exprimiert (Hakamata et al. 2001).

Nach Transplantation von Knochenmark EGFP-transgener Tiere auf nicht-transgene Tiere exprimieren im Empfängerorganismus somit ausschließlich diejenigen Zellen EGFP, die dem transplantierten Knochenmark der Spendertiere entstammen.

4.1.2 Tierhaltung

Alle Tiere waren in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Eppendorf untergebracht. Die Zucht der Tiere ist dort etabliert. Die Haltung erfolgte in Käfigen mit maximal fünf Tieren. UNX- und REMI-Tiere wurden voneinander getrennt gehalten. Es herrschte eine Temperatur von 21° C, eine Luftfeuchtigkeit von 50 – 60 % und ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden. Futter (Sniff Ratte Maus Haltung) und Wasser waren den Tieren jederzeit frei zugänglich.

4.2 Knochenmarksisolation aus EGFP-transgenen Wistarratten

Aus den Hinterläufen von männlichen EGFP-transgenen Wistarratten wurde das EGFP⁺-Knochenmark isoliert. Mittels Skalpell wurden die Hinterläufe grob von Muskelgewebe befreit, für die Feinsäuberung wurden Kompressen verwendet. Anschließend wurden Ober- und Unterschenkel manuell voneinander getrennt und mithilfe einer Knochenzange die Metaphysen eines jeden Knochens abgekappt. Ca. 15 ml einer Nährlösung wurden mit einer Spritze aufgezogen, die Kanüle in die Diaphyse eingeführt und unter stetigem Druck das Knochenmark mit der Nährlösung in eine Petrischale gespült. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Knochenmarkszellen zu erhalten, wurde diese Prozedur mehrere Male wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und auf Eis gelagert, bis alle Zellsuspensionen hergestellt waren.

Um die Zellsuspensionen von großen Gewebestücken zu befreien, wurden sie durch 70 µm Nylon-Zellsiebe in neue 50 ml Tubes gefiltert. Das Filtrat wurde danach 10 Minuten bei 1200 rpm und 4° C zentrifugiert, die Überstände verworfen, so dass nur noch die Zellpellets in den 50 ml Falconröhrchen verblieben. Diese Pellets wurden dann mit frischem Nährmedium resuspendiert und je nach Anzahl der zu transplantierenden Ratten in 10 - 15 ml gepoolt.

Zur Abschätzung der transplantierbaren Zellmenge erfolgte die Zellzählung in der Neubauer-Kammer mit einer Verdünnung von 1:100. Die Zellzahl aus vier Planquadraten wurde bestimmt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich als Produkt aus dem Mittelwert, dem Verdünnungsfaktor und einem zellkammerspezifischen Faktor von 10^5 . Für die Knochenmarkstransplantation standen pro Ratte etwa $1,3 \times 10^8$ EGFP⁺-Knochenmarkszellen zur Verfügung, die bis zur Transplantation auf Eis gelagert wurden.

4.3 Knochenmarksdepletion durch Ganzkörperbestrahlung

Die Ganzkörperbestrahlung der Empfänger-Ratten wurde zur Ablation des Knochenmarks eingesetzt und erfolgte vor Knochenmarkstransplantation mit je 9 Gray (Gy) pro Tier. Zum Zeitpunkt der Bestrahlung waren die Tiere ca. 50 - 80 g schwer und 4 - 6 Wochen alt.

4.4 Knochenmarkstransplantation in Wistarratten

Die Knochenmarkstransplantation (KMTx) erfolgte 8 - 10 Stunden nach Knochenmarksdepletion durch Ganzkörperbestrahlung. Die 80 - 90 g schweren und 4 - 6 Wochen alten Empfänger-Ratten (KMTx-Ratten) erhielten etwa $1,3 \times 10^8$ EGFP⁺-Knochenmarkszellen in einem Volumen von 1 ml unter Isoflurannarkose in die Schwanzvene injiziert. Da es sich um eine syngene Transplantation handelte, also eine Transplantation zwischen genetisch identischen Tieren, und Abstoßungsreaktionen deshalb nicht zu erwarten waren, wurde auf eine anschließende Immunsuppression verzichtet.

Nach der Transplantation hatten die Tiere ca. 8 - 10 Wochen Zeit, sich von der Bestrahlung und Transplantation zu erholen. Bevor mit den Versuchen zur Induktion der Nierenerkrankung begonnen wurde, wurde die erfolgreiche Transplantation mithilfe von Blutaussstrichen und FACS-Analysen verifiziert. Pro Knochenmark-transplantierte Gruppe überlebten ca. 1/4 der Tiere die KMTx nicht, wobei fehlendes Angehen des Transplantats und Infektionen als wahrscheinlichste Ursache zu erwägen sind.

4.5 Nachweis der erfolgreichen Knochenmarkstransplantation

4.5.1 Blutaussstriche

Den KMTx-Ratten wurde 500 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Etwa 3 µl des durch leichtes Schwenken durchmischten Blutes wurden auf den rechten Rand eines Objektträgers pipettiert. Ein zweiter Objektträger wurde danach so an den Blutstropfen angesetzt, dass sich das Blut an der Kante verteilte und im letzten Schritt unter einem Winkel von ca. 45° rasch zur linken Seite hinübergestrichen werden konnte. Nach kurzer Trocknungszeit von ca. 3 Minuten, konnte der Blutaussstrich fluoreszenzmikroskopisch auf EGFP⁺-Zellen untersucht werden. In den Fällen, in denen keine Fluoreszenz nachweisbar war, wurden noch zwei weitere Blutaussstriche angefertigt und mit drei negativen Blutaussstrichen die fehlgeschlagene Knochenmarkstransplantation festgestellt.

4.5.2 FACS-Analysen

Bei einigen Experimenten wurde der EGFP-Chimärismus im Blut mithilfe von FACS-Analysen (**F**luorescence-**A**ctivated **C**ell **S**orting = Durchflusszytometrie) genauer bestimmt und diente zur Bestätigung der Ergebnisse der Blutaussstriche. Der EGFP-Chimärismus im Blut entsteht durch überlebende Empfänger-Knochenmarkszellen nach KMTx. Hieraus ergibt sich ein Nebeneinander von Spender- und Empfänger-Knochenmarkszellen im Blut. Tiere, die in der FACS-Analyse keinen Chimärismus aufwiesen - die also nicht

erfolgreich transplantiert worden waren - wurden aus den Versuchsreihen ausgeschlossen.

4.6 Das REMI-Modell mit EGFP als Zelllinienmarker

Das REMI-Modell (**R**enal **E**ndothelial **M**icrovascular **I**njury) der Ratte stellt das Modell einer thrombotischen Mikroangiopathie dar. Es ist ein modifiziertes Modell des ursprünglich 1997 von der Arbeitsgruppe um Rick Johnson und William Couser etablierten und charakterisierten REMI-Modells (Nangaku et al. 1997). In unserem Modell wird eine erhebliche Endothelzellschädigung in der Niere durch selektive Perfusion der linken Arteria renalis mit einem anti-Endothelzell-Antikörper hervorgerufen. Da der anti-Endothelzell-Antikörper durch Immunisierung von Kaninchen mit glomerulären Ratten-Endothelzellen hergestellt wird, bindet er mit hoher Affinität an glomeruläres Endothel. Jedoch findet auch eine niedrig-affine Bindung an übriges Endothel statt. Als Reaktion auf die verursachte Schädigung kommt es zu einer akuten Funktionsverschlechterung der Niere, zu glomerulären sowie tubulointerstitiellen Läsionen mit Endothelzellschwellung und -verlust, Fibrinthromben, Sklerosierung, Tubulusatrophie und Infiltration von Entzündungszellen. Auch nach acht Wochen kommt es nicht zur Resolution des Nierenschadens.

Das REMI-Modell dient als Tiermodell für menschliche Erkrankungen, deren Nierenbeteiligung pathogenetisch primär auf eine Schädigung des Endothels zurückzuführen sind: das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), der Diabetes mellitus, die Vaskulitiden, die Schwangerschaftsgestose und die Transplantatabstoßung.

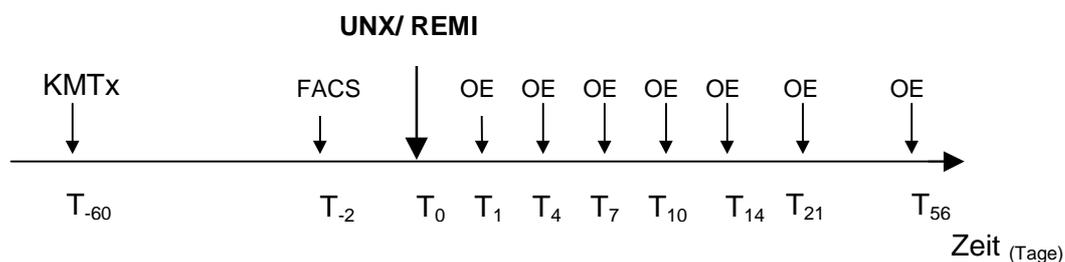
Um Knochenmarkszellen im Verlauf der REMI-Erkrankung verfolgen und fragliche Transdifferenzierungen in zelllinienfremde Zelltypen, wie Endothelzellen, erforschen zu können, wurde den Ratten vor Induktion der REMI-Erkrankung EGFP⁺-Knochenmark transplantiert (s. Kapitel 4.2 und 4.4).

4.6.1 Versuchsaufbau

Die KMTx-Ratten wurden vor Versuchsbeginn in zwei Gruppen geteilt: Bei den Versuchstieren (REMI-Tiere) wurde eine Uninephrektomie durchgeführt und im Anschluss die REMI-Erkrankung induziert. Bei den Kontrolltieren (UNX-Tiere) wurde ausschließlich eine Uninephrektomie durchgeführt.

Als Uninephrektomie (UNX) wird die Entnahme einer Niere bezeichnet. Die Uninephrektomie war notwendig, da aus technischen Gründen die zeitgleiche Perfusion beider Nieren nicht möglich war und eine Kompensation der durch den REMI-Antikörper verursachten Nierenschädigung durch die gesunde Niere verhindert werden sollte. Auch Kontrolltiere wurden uninephrektomiert, damit sich Kontroll- und Versuchstiere ausschließlich durch die Induktion von REMI und keinem weiteren Parameter voneinander unterscheiden.

Die Entnahme der Nieren für die morphologische Aufarbeitung erfolgte zu den Untersuchungszeitpunkten: 24 Stunden, 4 Tage, 7 Tage, 10 Tage, 14 Tage und 21 Tage nach Uninephrektomie bzw. Uninephrektomie und Induktion von REMI. Zusätzlich wurden noch weitere zwei REMI- und ein UNX-Tiere acht Wochen nach Uninephrektomie bzw. Induktion von REMI untersucht, um Veränderungen zu einem späten Zeitpunkt nach Induktion des Nierenschadens untersuchen zu können.



KMTx – Knochenmarksisolierung, Ganzkörperbestrahlung, Knochenmarktransplantation

FACS – Blutauszstrich, FACS-Analyse

UNX/ REMI – Uninephrektomie (UNX-Tiere) bzw. Uninephrektomie und Induktion von REMI (REMI-Tiere)

OE – Organentnahme

Tabelle 1: Graphische Darstellung des Versuchsaufbaus

Bei der Versuchsdurchführung wurde darauf geachtet, dass an einem Operationstag immer parallel gleich viele Tiere in beiden Gruppen operiert wurden. Zu den genannten Untersuchungszeitpunkten wurden bei mindestens drei Tieren pro Gruppe die Nieren für die morphologische Aufarbeitung entnommen.

4.6.2 Herstellung des anti-Endothelzell-Antikörpers

Zur Induktion von REMI wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper hergestellt, der sich gegen glomeruläre Endothelzellen (GECs) von Ratten richtet. Dafür wurden vier Kaninchen viermal im Abstand von jeweils einem Monat mit je ca. 5×10^9 glomerulären Ratten-Endothelzellen [freundlicherweise überlassen von Prof. Dr. G. Wolf, Jena], die einer nicht transformierten glomerulären Zelllinie entstammen (aus Sprague-Dawley-Ratten isoliert), subkutan immunisiert. Routinemäßig wurden die GECs in Dubecco's modified Eagle's medium, dem 100 U/ ml Penicillin, 100 µg/ ml Streptomycin und 10 % Hitze-inaktiviertes fetales Kalbsserum zugesetzt war, bei 37° C in 5 % CO₂ gezüchtet (Wolf et al. 1999). Zur Verstärkung der Immunantwort wurden die GECs den Kaninchen in Hunter Titer Max Gold gelöst subkutan gespritzt.

Eine Woche nach der vierten Boosterung wurden die Kaninchen entblutet, um den polyklonalen Antikörper zu gewinnen. Nach Komplement-Inaktivierung durch 40-minütiges Erhitzen bei 56° C im Wasserbad, wurde das Serum mittels einer Amiconsäule bei 4° C über Nacht um das 4- bis 5-fache konzentriert und auf ein Volumen von ca. 120 ml eingengt. Dieser Kaninchen-Antikörper wurde verwendet, um in Wistarratten die REMI-Erkrankung herbeizuführen.

4.6.3 Uninephrektomie und Induktion von REMI

Zur Uninephrektomie und Induktion von REMI wurde unter Isofluran-Inhalationsnarkose das Fell der Tiere rasiert, desinfiziert und die Bauchhöhle durch einem Schnitt entlang der Linea alba eröffnet. Alle Tiere wurden rechtsseitig uninephrektomiert. In die linke Arteria femoralis wurde ein Katheter

eingeführt und bis zum Abgang der linken Arteria renalis vorgeschoben. Zur Vermeidung von Vasospasmen wurde beim Einführen des Katheters eine Lokalanästhesie mit Lidocain 2 % durchgeführt. Der Blutfluss in der Aorta wurde oberhalb des Abgangs der Nierenarterie mit einer Klemme und unterhalb des Abgangs der Nierenarterie mit einem Faden unterbunden. Über den Katheter konnte die linke Niere nun mit 1 ml 4° C kaltem PBS (Phosphate-Buffered Saline) perfundiert werden. Bei den Versuchstieren erfolgte anschließend die Perfusion mit dem anti-Endothelzell-Antikörper (ca. 0,7 - 0,8 ml bei 200 g Körpergewicht). Hieran schloss sich eine erneute Perfusion mit 0,3 ml PBS an, um den Antikörper quantitativ aus dem Kathetersystem zu eluieren. Die Kontrolltiere wurden nicht perfundiert, denn in Vorversuchen war gezeigt worden, dass kein Unterschied zwischen nicht perfundierten, PBS-perfundierten und normalen IgG-perfundierten Nieren bestand. Schließlich wurde der Faden unterhalb des Abgangs der Nierenarterie wieder entfernt und der Katheter gezogen. Die Femoralarterie wurde - um Blutungen zu vermeiden - endgültig ligiert, so dass das Bein fortan über Kollateralkreisläufe versorgt wurde. Anschließend wurde die Aortenklemme entfernt und die Nierendurchblutung nach einer Ischämiezeit von weniger als fünf Minuten wieder hergestellt. Nur solche Tiere wurden in der Versuchsreihe belassen, bei denen die Reperfusion makroskopisch sofort einsetzte und die gesamte Niere betraf. Im letzten Schritt wurde die Bauchhöhle mit fortlaufenden Nähten und das Fell mit Klammern schichtweise wieder verschlossen. Nach Abschluss des operativen Eingriffs wurden die Tiere bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer beheizten Decke gelagert. Zur Schmerzbekämpfung erhielten die Tiere in den ersten drei Tagen nach der Operation Novaminsulfon im Trinkwasser angeboten.

4.6.4 Organentnahme und Probenverarbeitung

Zu den Untersuchungszeitpunkten 24 Stunden, 4 Tage, 7 Tage, 10 Tage, 14 Tage, 21 Tage sowie 8 Wochen nach Uninephrektomie bzw. Uninephrektomie und Induktion der REMI-Erkrankung wurden die jeweiligen Tiere erneut mit Isofluran narkotisiert und der Bauch mit einem Medianschnitt eröffnet. Die Aorta

wurde stumpf freipäpariert und ein Butterfly in der Aorta unterhalb des Abgangs der Arteria renalis sinistra plaziert. Der Butterfly wurde mit einer Gefäßklemme fixiert und einige Milliliter Blut zur erneuten Anfertigung eines Blutausstriches und zur Gewinnung von Serum für Bestimmungen von Kreatinin und Harnstoff abgenommen. Anschließend wurde die Aorta oberhalb der Nierenarterien mit einer zweiten Gefäßklemme abgeklemmt und 150 ml PBS über den Butterfly infundiert um die Nieren blutleer zu spülen. Über die eröffnete Vena cava konnte das zugeführte Volumen wieder entweichen. Pro Tier wurden dann 20 ml einer frisch angesetzten Perfusionslösung, bestehend aus 4 % Paraformaldehyd und 4 % Sucrose, infundiert und die linke Niere entnommen. Die Tiere wurden anschließend durch eine Überdosis an Isofluran getötet. Zügig wurden die entnommenen Nieren horizontal in sechs Teile geschnitten. Drei Teile wurden in 4 % Formalin für Paraffinschnitte überführt, zwei Teile in 30 % Sucrose für Gefrierschnitte. Das letzte Teil wurde für eventuell geplante, weitere molekularbiologische Untersuchungen in einem Eppendorf Gefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Sowohl das in Formalin als auch das in Sucrose gelagerte Gewebe wurde nach der Nierenentnahme eine Nacht lichtgeschützt und bei 4°C aufbewahrt. Kühlung und Abdunkelung waren wichtig, um die EGFP-Fluoreszenz zu erhalten.

4.6.4.1 Serumzentrifugation

Zügig nach der Organentnahme wurde das Blut bei 4°C für zehn Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Serum in ein Eppendorf Reagiergefäß abpipettiert und bis zur Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff bei -80°C gelagert.

4.6.4.2 Formalingewebe

Am darauffolgenden Tag wurde das Formalin fachgerecht entsorgt und das Gewebe sechsmal alle 30 Minuten mit 7 ml PBS gewaschen mit dem Ziel,

überschüssiges Formalin aus dem Gewebe zu entfernen. Es wurde darauf geachtet, das Gewebe während dieses Vorgangs lichtgeschützt und kühl zu lagern.

Um eine längerfristige Lagerung zu ermöglichen, wurde nach dem letzten PBS-Waschgang das Gewebe in Cacodylatpuffer mit Sucrose lichtgeschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

Um das Paraffin in das Nierengewebe einzuführen, wurde das Gewebe in einer vollautomatischen Citadelle prozessiert: Sieben Bäder in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 60%, 70%, 96%, 96%, 100%, 100%, 100%) führten zur Verdrängung des Gewebewassers. Drei Bäder in Xylol ersetzen das Ethanol und zwei Bäder Paraffin führten zu der für die Herstellung von Gewebeschnitten notwendigen Durchtränkung des Gewebes mit Paraffin. Bei verschiedenen, festgelegten Einzelzeiten pro Bad verblieb das Gewebe insgesamt 15 Stunden in der Citadelle. Automatisch wurde das Gewebe, welches sich in vorher beschrifteten kleinen Kassetten befand, in den jeweils nächsten Behälter überführt. Bis auf die beiden Paraffinbäder mit 58° C und 59° C hatten die übrigen Bäder Zimmertemperatur.

Die Gewebestücke aus der Citadelle wurden anschließend an der Gießstation der Einbetteneinheit mit flüssigem Paraffin zu Paraffinblöcken gegossen, die nach Erkalten mit dem Mikrotom geschnitten werden konnten.

4.6.4.3 Sucrosegewebe

Das über Nacht in 30 % Sucrose belassene Gewebe wurde am nächsten Tag eingefroren. Sucrose verhindert dabei die Bildung von Eiskristallen, die die Histologie der Gewebestücke zerstören würden. Das Material wurde auf ein ca. 3 x 3 cm großes Quadrat aus Alufolie gelegt, mit einem Kimwipe von überschüssiger Sucrose befreit, mit etwas Tissue Tek benetzt, zusammengefaltet und mit einer Pinzette für ca. 20 Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten. Anschließend erfolgte die Lagerung bei – 80° C. Dieses Material stand nun zur Anfertigung von Gefrierschnitten zur Verfügung.

4.7 Histologie

4.7.1 Allgemeines

Um die Gewebeschnitte untersuchen zu können, kamen histologische Techniken zum Einsatz. Das Prinzip der Immunhistologie beruht auf Antigen-Antikörperreaktionen. Ein Primärantikörper bindet mit hoher Affinität und hochspezifisch ein bestimmtes Epitop, das sich sowohl intra- wie auch extrazellulär befinden kann. Der Sekundärantikörper, der im Falle der indirekten Immunhistologie mit einem Enzym oder Farbstoff gekoppelt ist, bindet das F_c-Fragment des Primärantikörpers und Zugabe des Substrates führt zur erwünschten Farbreaktion. Im Falle der Immunfluoreszenz ist der Sekundärantikörper mit einem Chromogen gekoppelt: Hier kommt es durch optische Anregung unter dem Fluoreszenzmikroskop zur Farbentstehung.

Diese sogenannte 'indirekte Methode' ist der 'direkten', bei der der Primärantikörper bereits mit einem Enzym bzw. Chromogen gekoppelt ist, insoweit überlegen, als dass es zu einer Signalverstärkung kommt, was vor allem gewünscht ist, wenn das Epitop selten ist.

4.7.2 Gefrierschnitte

Von jedem Tier wurden mit dem Kryostaten bei – 28° C Gefrierschnitte einer Dicke von 10 µm angefertigt. Die Temperatur musste so tief gewählt werden, da das in 30 % Sucrose über Nacht fixierte Gewebe bei höheren Temperaturen nur unvollständig gefroren war und sich ein Schneiden als nahezu unmöglich erwies.

Auf einen kleinen Schneidebolzen des Kryotoms wurden einige Tropfen des bei Raumtemperatur flüssigen Tissue Teks gebracht. In diese Tropfen wurde fest das kleine Gewebestück des jeweiligen Tieres gedrückt und sparsam auch die Oberseite mit Tissue Tek benetzt. Dieses gefriert im Kryostaten und macht das Gewebe dem Schneiden zugänglich. Die Aufnahme der Gefrierschnitte auf die Objektträger gelang aufgrund von elektrostatischer Anziehung. Nach zehnminütiger Fixierung in – 28°C kaltem 96 % Ethanol wurden die Schnitte an

der Luft getrocknet. Jeder Gewebeschnitt wurde mit einem wasserabweisenden Stift (Pap-pen) umrandet, um die Fläche zur späteren Antikörperapplikation möglichst klein zu halten. Das Gewebe konnte nun für Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden.

4.7.2.1 ToPro 3-Färbung

ToPro 3 gehört zu einer Familie von Farbstoffen, die monomere Nucleinsäuren färben und damit den Kern einer Zelle sichtbar machen. Diese Färbung wurde zur Bestimmung der EGFP-Zellzahl durchgeführt.

Nach Anfertigung der Gefrierschnitte wurden diese fünf Minuten mit PBS (Phosphate buffered saline) gewaschen. Anschließend wurde das Gewebe mit ToPro 3 1:1000 in PBS verdünnt für fünf Minuten inkubiert, gefolgt von erneutem Waschen mit PBS für fünf Minuten. Im letzten Schritt wurde das Gewebe mit Fluoromount eingedeckt und einen Tag bei Raumtemperatur belassen, um ein Trocknen des Eindeckmediums zu ermöglichen. Bis zur Analyse wurden die Schnitte lichtgeschützt und kühl gelagert.

4.7.2.2 ED-1-Färbung und Reca-1-Färbung

Zum Nachweis von Makrophagen wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen ED1, einem Glykoprotein auf der lysosomalen Membran von Ratten-Myeloidzellen, durchgeführt. Blutgefäße wurden mithilfe des monoklonalen Antikörpers Reca-1 nachgewiesen, der ein sich apikal befindliches Oberflächenantigen von Ratten-Endothelzellen erkennt.

Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden Gefrierschnitte von 10 µm Dicke hergestellt. Nach Lufttrocknung und dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils fünf Minuten wurden die unspezifischen Antikörperbindungsstellen für 30 Minuten mit normalem Pferdeserum 1:20 verdünnt in PBS geblockt. Die Primärantikörper konnten dann in einer Verdünnung von 1:100 (für ED-1) und 1:400 (für Reca-1) in 1:20 normalem Pferdeserum auf die Gewebeschnitte pipettiert werden und über Nacht bei 4°C inkubiert werden. Einer der vier Schnitte pro

Objektträger diente dabei als Negativ-Kontrolle für die Färbung und wurde dementsprechend nur mit 1:20 normalem Pferdeserum inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde erneut dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper Cy3 Esel anti-Maus IgG, der das F_c-Teil von Maus-IgG erkennt, in einer Konzentration von 1:200 (für ED-1) bzw. 1:600 (für Reca-1) in 1:20 normalem Pferdeserum auf alle vier Schnitte pipettiert und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde einmal fünf Minuten mit PBS gewaschen, dann zur Zellkernfärbung mit ToPro 3 1:1000 in PBS für fünf Minuten inkubiert und erneut mit PBS für fünf Minuten gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Präparate mit Fluoromount eingedeckt, einen Tag bei Raumtemperatur belassen um ein Trocknen des Eindeckmediums zu ermöglichen und danach bis zur Analyse lichtgeschützt und kühl gelagert.

4.7.3 Paraffinschnitte

Das in Paraffinblocks eingebettete Gewebe wurde für mehrere Stunden auf –20 °C gekühlt, um die Schneideigenschaften zu verbessern. Danach wurden mit dem Mikrotom nach dem Anschneiden des Blocks, abhängig von der Verwendungsabsicht, 1 bis 5 µm dicke Schnitte angefertigt und drei bis vier Schnitte pro Objektträger aufgezogen.

Vor Beginn der Färbungen mussten die Schnitte zur Verbesserung der Objektträgerhaftung über Nacht bei 40° C im Ofen gebacken werden. Die Deparaffinierung und Rehydrierung gelang über eine absteigende Alkoholreihe (Je fünf Minuten: Xylol, Xylol, Xylol, EtOH 100%, EtOH 100%, EtOH 96%, EtOH 96%, EtOH 75%, EtOH 75%, H₂O, H₂O).

4.7.3.1 Kaninchen-IgG-Färbung

Die REMI-Erkrankung wurde mithilfe eines anti-Ratten-Endothelzell-Antikörpers aus dem Kaninchen induziert. Mit der anti-Kaninchen-IgG-Färbung sollte dieser applizierte Antikörper nachgewiesen werden.

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden 1 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte, mit Proteinase-K 1:1000 in PBS verdünnt, zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Proteasereaktion wurden die Schnitte kurz in 100 % Ethanol gedippt und anschließend in H₂O überführt, welches dreimal alle fünf Minuten erneuert wurde. Um die unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu blocken, wurden die Präparate mit 1:20 normalem Pferdeserum in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Cy3 Esel anti-Kaninchen in einer Konzentration von 1:200 in 1:20 normalem Pferdeserum auf die Schnitte pipettiert, um den Primärantikörper zu detektieren, der den Tieren zu Lebzeiten direkt in die Nierenarterie gespritzt worden war. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Inkubationszeit durch Waschen mit PBS beendet, welches dreimal alle fünf Minuten gewechselt wurde. Die Schnitte wurden in einem letzten Schritt mit Fluoromount eingedeckt und bis zur Analyse lichtgeschützt und kühl gelagert.

4.7.3.2 PAS-Färbung

Die PAS-Färbung (Periodic acid-Schiff) weist kohlenhydrathaltige Substanzen, wie Glykoproteine, neutrale Mukopolysaccharide und Glykogen nach, die sich beispielsweise in Basalmembranen und Schleimen befinden. Sie erscheinen in der PAS-Färbung rot. Durch die Zellkern-Gegenfärbung mit Hämalaun werden Zellkerne blau angefärbt.

Für die histochemische Färbung wurden 1 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Nach einer Minute in Aqua dest. wurden die Gewebeschnitte für 15 Minuten in 1 % Perjodsäure belassen und danach für zwei bis drei Minuten unter fließendem Leitungswasser gespült. Die Präparate wurden erneut kurz in Aqua dest. getaucht, bevor sie für 40 Minuten in Schiff'sches Reagenz überführt wurden. Hieran schloss sich ein fünfminütiges Spülen unter fließendem, warmen Leitungswasser an, gefolgt von kurzem Verweilen in Aqua dest.. Für die Zellkern-Gegenfärbung wurden die Schnitte für eine Minute in Hämalaun

gestellt und anschließend eine Minute unter fließendem Wasser gespült. Nach mikroskopischer Kontrolle der Färbung wurde gegebenenfalls noch in HCl-Alkohol differenziert. Eine aufsteigende Alkoholreihe (2 Min. EtOH 70%, 2x 2 Min. EtOH 96%, 2 Min. EtOH 100%, 5 Min. EtOH 100%, 10 Min. EtOH 100%, 3x 5 Min. Xylol) schloss sich an. Die Schnitte wurden im letzten Schritt mit Eukitt eingedeckt und bei Raumtemperatur gelagert.

4.7.3.3 Doppelfärbung PCNA und EGFP

Das 'Proliferating cell nuclear antigen' (PCNA) ist ein 37 kDa schweres nukleäres Protein, das während des gesamten Zellzyklusses exprimiert wird und als solches als Proliferationsmarker Verwendung findet. In der frühen S-Phase zeigt sich ein diffuses Verteilungsmuster und die Aussparung der Nucleoli. In der späten S-Phase ist PCNA auch in den Nucleoli nachweisbar.

Durch die Fixierung in Formalin und die Einbettung in Paraffin können durch Quervernetzung von Proteinen manche Antigene maskiert werden, die für die Bindung eines Antikörpers bei immunhistologischen Färbungen nötig sind. In diesem Fall kommen Antigendemaskierungsmethoden zum Einsatz, um die Antigenität wieder herzustellen. Durch die nachfolgend beschriebene Antigendemaskierungsmethode mit Citratpuffer pH 6,1 wird die native EGFP-Fluoreszenz zerstört. Aus diesem Grund musste zusätzlich mit einem anti-GFP-Antikörper gearbeitet werden.

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden 5 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Zur Antigendemaskierung diente das Kochen der Schnitte in einem Liter Citratpuffer pH 6,1 für 35 Minuten in der Mikrowelle bei 680 W. Auf Eiswasser wurden die sich noch im Citratpuffer befindlichen Objektträger für 15 Minuten gekühlt. Anschließend wurden die Schnitte dreimal für jeweils fünf Minuten mit H₂O gewaschen. Um die freie Passage des Antikörpers zu seinem Target im Zellkern zu gewährleisten, wurden die Zellmembranen mittels 0,3 % Triton-X-100 verdünnt in PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgebrochen. Danach erfolgte der Block unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 1:20 normalem Pferdeserum verdünnt in 0,3 % Triton-X-100 für 30 Minuten bei

Raumtemperatur. Die Primärantikörper Maus anti-PCNA und Kaninchen anti-GFP konnten dann in einer Verdünnung von jeweils 1:50 in 1:20 normalem Pferdeserum in 0,3 % Triton-X-100 auf die Gewebeschnitte pipettiert werden und über Nacht bei 4°C inkubieren.

Einer der vier Schnitte pro Objektträger diente dabei als Negativ-Kontrolle für die Färbung und wurde dementsprechend nur mit 0,3 % Triton-X-100 mit 1:20 normalem Pferdeserum inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde erneut dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern Esel Cy3 anti-Maus und Esel Cy2 anti-Kaninchen in einer Konzentration von jeweils 1:200 in 1:20 normalem Pferdeserum in PBS verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal für jeweils fünf Minuten mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Gewebe mit Fluoromount eingedeckt, einen Tag bei Raumtemperatur belassen um ein Trocknen des Eindeckmediums zu ermöglichen und danach bis zur Analyse lichtgeschützt und kühl gelagert.

4.8 Mikroskopie

4.8.1 Lichtmikroskopie

Die Durchlichtmikroskopie, bei der das Präparat von unten durchleuchtet wird, wurde in dieser Promotionsarbeit dazu genutzt, die Histologie der PAS-gefärbten Nierenpräparate zu beurteilen.

Das Okular des verwendeten Axioskops 20 hat eine 10-fache Vergrößerung. Für die morphologischen Studien wurden größtenteils das 20- und 40-er Objektiv verwendet. Um Detailfragen zu klären kam auch das 100-er Ölimmersions-Objektiv zum Einsatz. Bilder wurden mit 20- und 40-er Objektiven aufgenommen, was einer Gesamtvergrößerung von 200- und 400-fach entspricht, da sie das Produkt von Okular- und Objektivvergrößerung ist.

4.8.2 Fluoreszenzmikroskopie

Das Axioskop 20 konnte durch Verwendung von Filtern zur Untersuchung von Immunfluoreszenzfärbungen genutzt werden. Die Excitationswellenlängen der beiden Filter betragen 450 - 490 nm zur Detektion von EGFP und 546 nm zur Detektion von Cy3. Hier wurde mit Auflichtmikroskopie gearbeitet und größtenteils mit 200- und 400-facher Vergrößerung.

Am Fluoreszenzmikroskop wurden qualitative Untersuchungen durchgeführt, die Quantifizierung und genauere Untersuchung auf Ko-Lokalisationen erfolgte am konfokalen Mikroskop (s. unten).

4.8.3 Konfokale Mikroskopie

Die Konfokale Mikroskopie wurde für Ko-Lokalisationsuntersuchungen und zur Quantifizierung von Zellen eingesetzt. Zwei entscheidende Vorteile des Konfokalen Lasermikroskops gegenüber Fluoreszenzmikroskopen machen es attraktiv für Ko-Lokalisationsuntersuchungen: Zum einen besteht die Möglichkeit, das Präparat fokussiert und überlagerungsfrei schrittweise zu durchscannen, zum anderen erlaubt es die simultane Detektion verschiedener Kanäle. Das verwendete LSM 510 meta ist mit drei Lasern ausgestattet. Ein Argon-Laser mit Excitationsmaximum bei 488 nm zur Detektion von EGFP (grüne Fluoreszenz), ein Helium-Neon-Laser mit Excitationsmaximum bei 543 nm zur Detektion von Cy3 (rote Fluoreszenz) und einem zweiten Helium-Neon-Laser mit Excitationsmaximum bei 633 nm zur Detektion von ToPro 3 (dunkelrote Fluoreszenz, zur besseren Diskriminierung jedoch computertechnisch als blaue Fluoreszenz dargestellt). Durch Verwendung eines 63-er Objektivs und eines 10-er Okulars wurde eine 630-fache Gesamtvergrößerung erreicht.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei REMI um die Induktion einer akuten Entzündung handelt, die primär Blutgefäße schädigt, wurde das Gewebe konfokal auf Ko-Lokalisationen von EGFP⁺-Zellen mit Makrophagen, als eine

der Hauptakteure bei Entzündungen, und auf Ko-Lokalisationen von EGFP⁺-Zellen mit Endothelzellen untersucht.

4.8.3.1 Quantifizierung und Ko-Lokalisationsuntersuchungen

Zur Quantifizierung infiltrierender EGFP⁺-Knochenmarkszellen wurden stets 50 Glomeruli pro Tier und Färbung verblindet nach unten genannten Kriterien ausgezählt.

Von allen Tieren wurde eine EGFP-Zellzählung durchgeführt, um die Anzahl an Zellen aus dem transplantierten Knochenmark pro Glomerulum zu erhalten und eventuell vorhandene Unterschiede zwischen UNX- und REMI-Tieren feststellen zu können. Bei der Zählung wurden nur solche Zellen berücksichtigt, die den mit ToPro 3 gefärbten, blauen Zellkern enthielten, umgeben von grünem, EGFP⁺-Cytoplasma. EGFP⁺-Zellen ohne Zellkern wurden nicht gezählt. Eine Ausnahme stellte die Reca-1-Färbung dar (s. unten).

Ko-Lokalisationen von EGFP⁺-Zellen mit Makrophagen (EGFP⁺-ED-1⁺-Zellen) wurden bei den 4-Tages-, 10-Tages und 21-Tages-Tieren mithilfe der ED-1-Färbung ermittelt und gezählt. Mit der ED-1-Färbung wird die lysosomale Membran gefärbt, so dass hier Zellen mit blauem Zellkern und im grünen Cytoplasma befindlichen roten Vesikeln gezählt wurden. Im Zuge dieser Prozedur wurde neben dem Zählen der Ko-Lokalisationsereignisse (EGFP⁺-ED-1⁺-Zellen) parallel erneut die Gesamtzahl aller EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum erfasst, um den Prozentanteil von EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen an allen EGFP⁺-Zellen zu erhalten.

Bei der Reca-1-Färbung sollten Ko-Lokalisationen von EGFP⁺-Zellen mit Endothelzellen (EGFP⁺-Reca-1⁺-Zellen) der 10-Tages- und 21-Tages-Tiere erforscht und gezählt werden. Die Reca-1-Färbung färbt Blutgefäße. Als membranständiger Marker musste hier die Zugehörigkeit von Reca-1⁺-Membran und EGFP⁺-Cytoplasma in jedem Fall genauestens beurteilt werden, um sicher zu sein, dass die rot gefärbte Membran wirklich die Membran der EGFP⁺-Zelle war. Als Grundlage der Analyse diente hier das Fluoreszenzmuster der Reca-1-Färbung bei EGFP-transgenen Tieren, bei

denen prinzipiell alle Endothelzellen cytoplasmatisch EGFP exprimierten und somit das Erscheinungsbild von Ko-Lokalisationen genau studiert werden konnte. Das Vorhandensein eines Zellkerns bei der Quantifizierung von EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen war nicht zwingend: Aufgrund des seltenen Ko-Lokalisationsereignisses wurden auch Zellen gezählt, deren Zellkern außerhalb der Schnittebene lag, sofern es sich eindeutig um Ko-Lokalisationen handelte. Da auch hier parallel alle EGFP⁺-Zellen in jedem untersuchten Glomerulum gezählt wurden, musste, wenn eine Ko-Lokalisation ohne Zellkern gefunden wurde, der parallelen EGFP⁺-Zellzählung je eine Zelle addiert werden.

Die Erstellung von Zählkriterien war erforderlich, um an verschiedenen Tagen vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Die Vorgehensweise ist im Folgenden nochmals tabellarisch zusammengefasst:

	EGFP-Zellzählung	ED-1/ EGFP-Ko-Lokalisationszählung	Reca-1/ EGFP-Ko-Lokalisationszählung
Anzahl	50 Glomeruli / Tier	50 Glomeruli / Tier	50 Glomeruli / Tier
Zeitpunkte	24h, 4d, 7d, 10d, 14d, 21d	4d, 10d, 21d	10d, 21d
Vorgehen	verblindet	verblindet	verblindet
Zellkriterien	<ul style="list-style-type: none"> • EGFP⁺-Cytoplasma • mit ToPro 3 gefärbtem Zellkern 	<ul style="list-style-type: none"> • EGFP⁺-Cytoplasma • mit ToPro 3 gefärbtem Zellkern • und ED-1⁺-Vesikeln intracytoplasmatisch 	<ul style="list-style-type: none"> • Vorbild: Ko-Lokalisationen bei EGFP-transgenen Tieren • EGFP⁺-Cytoplasma auf basaler Seite der Reca-1-Färbung

	EGFP-Zellzählung	ED-1/ EGFP-Ko-Lokalisationszählung	Reca-1/ EGFP-Ko-Lokalisationszählung
			<ul style="list-style-type: none"> • Reca-1-Färbung dem Kapillarlumen zugewandt • Konkave Seite des ToPro-3 gefärbten Zellkerns der Reca-1-Färbung zugewandt
Besonderes		<ul style="list-style-type: none"> • Parallel erneute EGFP-Zellzählung 	<ul style="list-style-type: none"> • Parallel erneute EGFP-Zellzählung • Zählung von Ko-Lokalisationen, auch wenn Zellkern außerhalb der Schnittebene Konsequenz: EGFP-Zellzahl + je 1 Zelle bei paralleler EGFP-Zellzählung

Tabelle 2: Zählkriterien am konfokalen Mikroskop

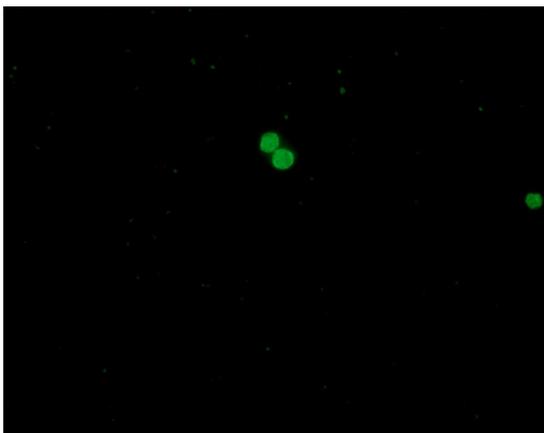
5 Ergebnisse

5.1 Die Knochenmarkstransplantation war erfolgreich

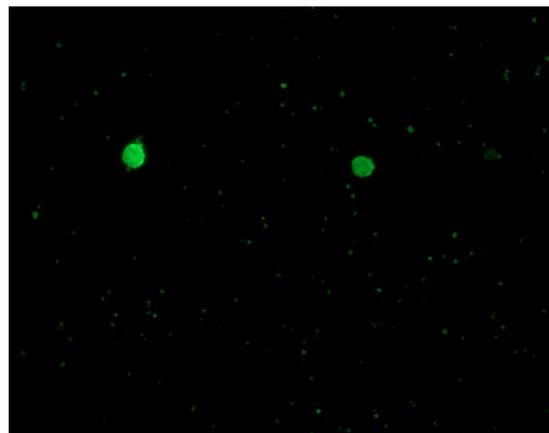
5.1.1 Blutausstriche zeigen Chimärismus

Alle für die Versuchsreihen verwendeten Tiere wiesen im Blutausstrich EGFP⁺-Leukozyten auf. Tiere, bei denen auch bei dreimalig wiederholtem Blutausstrich keine EGFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

Abbildung 1: Blutausstriche



UNX 7 Tage (23), 400x

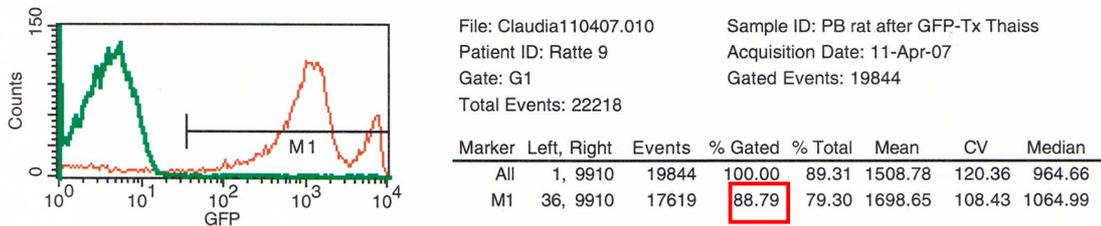


REMI 10 Tage (79), 400x

5.1.2 FACS-Analysen bestätigen die Ergebnisse der Blutausstriche

Die zur Bestätigung der Ergebnisse der Blutausstriche durchgeführten FACS-Analysen ergaben einen EGFP-Chimärismus von im Mittel 87 %. Auch hier musste - analog zu den Ergebnissen der Blutausstriche - bei einem Teil der getesteten Tiere (ca. 7 %) die fehlgeschlagene Knochenmarkstransplantation konstatiert werden, was zum Ausschluss von den Versuchen führte.

Abbildung 2: FACS-Analyse



5.2 REMI-Tiere werden krank und der Nierenschaden heilt nicht aus

5.2.1 Die PAS-Färbung zeigt die durch REMI induzierten Schäden

Es wurden von allen Tieren PAS-Färbungen durchgeführt, um histologisch zu sichern, dass die REMI-Tiere erkrankt waren und um den Verlauf der Erkrankung über die Zeit zu verfolgen.

Die unten beschriebenen Läsionen und gezeigten Bilder (s. Abb. 3) stellen repräsentative Glomeruli und Tubulointerstitii des jeweiligen Zeitpunktes dar.

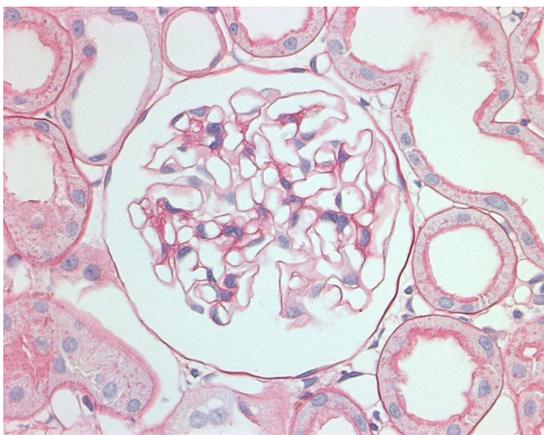
Bereits 24 Stunden nach Induktion von REMI ließen sich die Folgen der massiven Endothelschädigung erkennen. Die Glomeruli wiesen eine hohe Anzahl von Fibrinthromben in den Kapillarlumina auf und zeigten eine Zunahme der mesangialen Matrix. In den teils stark dilatierten Tubuli waren hyaline Zylinder und Resorptionsvesikel als Ausdruck einer starken Proteinurie nachweisbar.

Nach vier Tagen waren glomerulär verdickte Kapillarwände mit geschwollenen Endothelzellen und Podozyten sowie eine starke Proteinablagerungen zu sehen. Die Zunahme an mesangialer Matrix schien leicht rückläufig zu sein. Im Tubulointerstitium konnte neben hyalinen Zylindern und Resorptionsvesikeln eine beginnende Sklerosierung festgestellt werden. Diese pathologischen Veränderungen beherrschten das Bild bis einschließlich zum Tag 10. Am Tag 14 konnte zudem glomerulär und tubulointerstitiell eine zunehmende Sklerosierung festgestellt werden. Viele Tubuli waren atrophisch und hatten ihren Bürstensaum verloren. Am Tag 21 konnten auch Adhäsionen in den

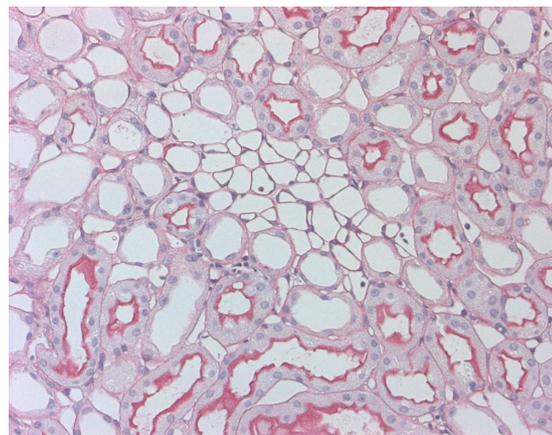
größtenteils stark sklerosierten Glomeruli gefunden werden. Auch nach 8 Wochen kam es nicht zur Resolution des Nierenschadens. Es konnten hier zusätzlich zu den bereits beschriebenen Läsionen Aufspaltungen der glomerulären Basalmembran nachgewiesen werden. Das Tubulointerstitium war weiterhin sklerotisch und zeigte Tubulusatrophien.

UNX-Tiere wiesen eine weitgehend normale Nierenhistologie auf.

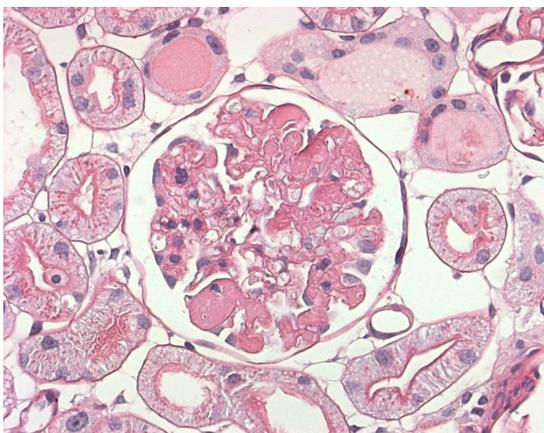
Abbildung 3: Nierenhistologie in der PAS-Färbung



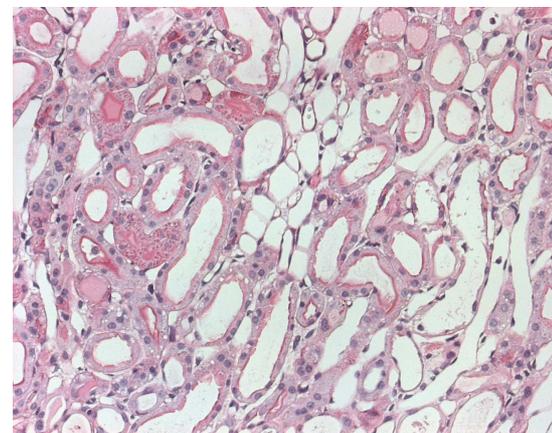
UNX 21 Tage (17), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x



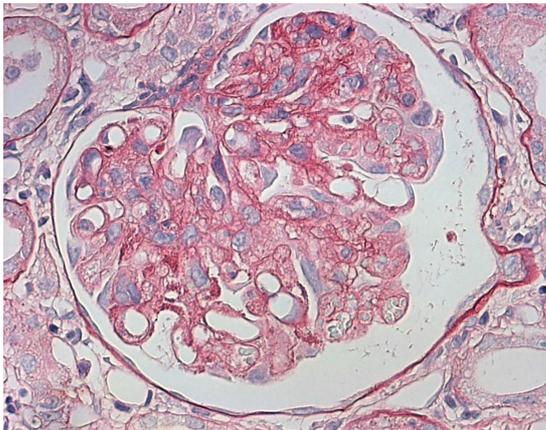
UNX 21 Tage (17), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 200x



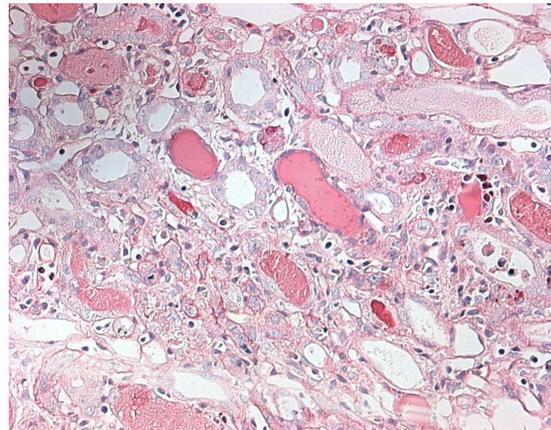
REMI 24 Stunden (30), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x



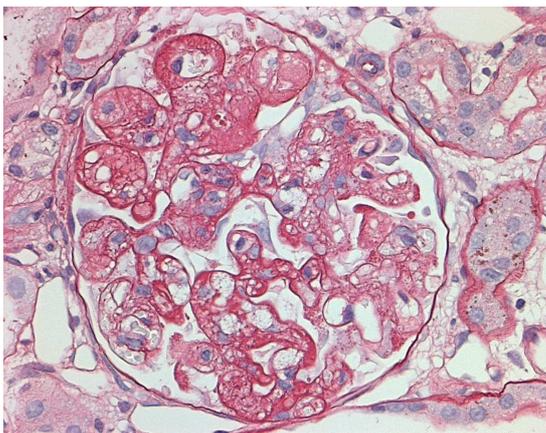
REMI 24 Stunden (30), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 200x



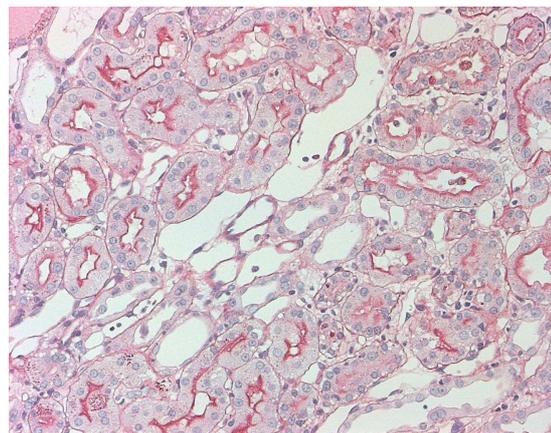
REMI 7 Tage (32), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x



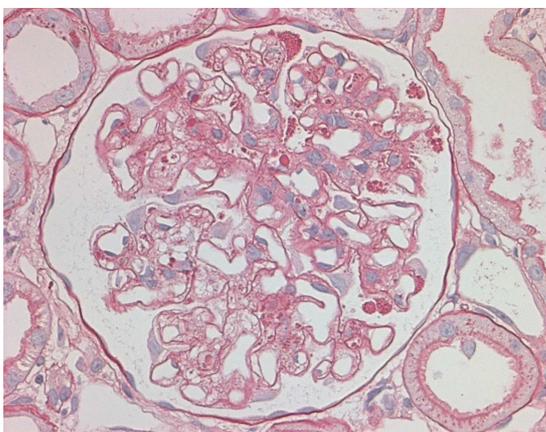
REMI 7 Tage (32), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 200x



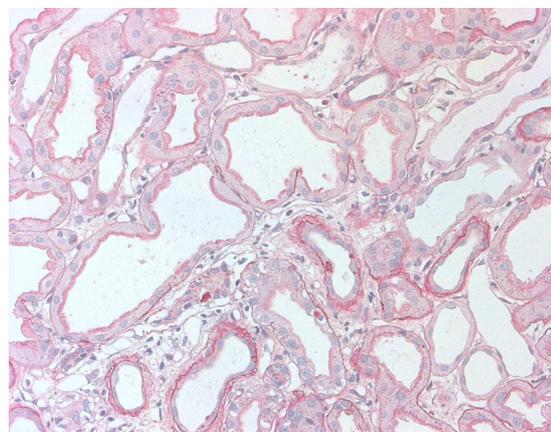
REMI 14 Tage (34), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x



REMI 14 Tage (34), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 200x



REMI 8 Wochen (89), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x



REMI 8 Wochen (89), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 200x

5.2.2 Kaninchen-IgG hat an die Endothelzellen der Ratte gebunden

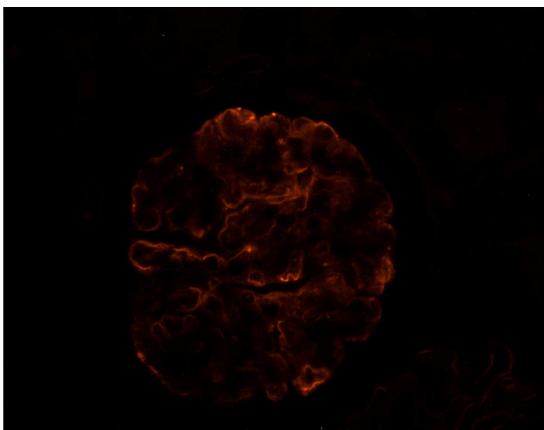
Die Kaninchen-IgG-Färbung wurde angefertigt, um den zur Induktion von REMI verwendeten Kaninchen-Antikörper gegen glomeruläre Ratten-Endothelzellen nachzuweisen (s. Abb. 4).

Bei den UNX-Tieren, denen der anti-Endothelzell-Antikörper nicht appliziert worden war, war zu keinem Zeitpunkt weder glomerulär noch tubulointerstitiell spezifische Fluoreszenz nachweisbar.

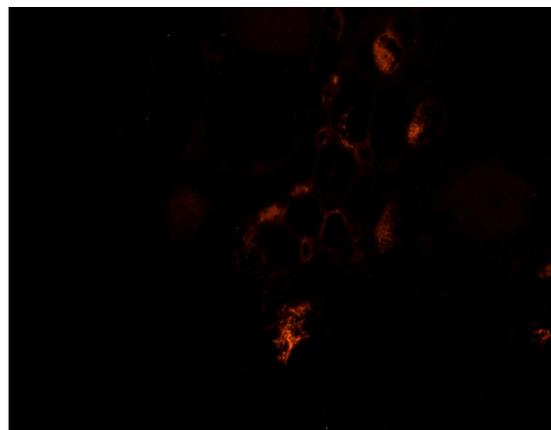
Bei den REMI-Tieren konnte der Antikörper hingegen glomerulär bis zum Tag 7 sehr gut als lineare Färbung entlang der Kapillaren detektiert werden. Sehr viel schwächer, bzw. überhaupt nicht mehr nachweisbar, war die spezifische Fluoreszenz ab Tag 10, wahrscheinlich begründet durch enzymatischen Abbau des Antikörpers oder Absterben der Endothelzellen.

Im Tubulointerstitium konnte eine Bindung des gespritzten Kaninchen-Antikörpers an peritubuläre Kapillaren nachgewiesen werden. Diese war jedoch nicht so prominent wie in glomerulären Kapillaren. Zudem wurde eine unspezifische Anfärbung des proteinhaltigen Tubuluslumens sichtbar. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Glomeruli, konnte auch hier der Antikörper bis zum Tag 7 nachgewiesen werden, ab Tag 10 gab es keine bzw. sehr schwache spezifische Fluoreszenz.

Abbildung 4: Darstellung des abgelagerten Kaninchen-IgG



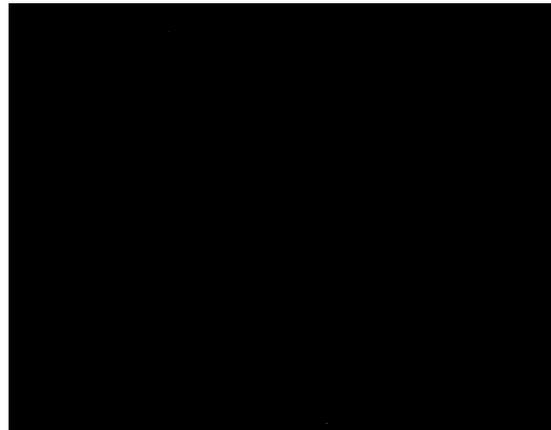
REMI 24 Stunden (30), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x



REMI 24 Stunden (30), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 400x



UNX 24 Stunden (7), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x

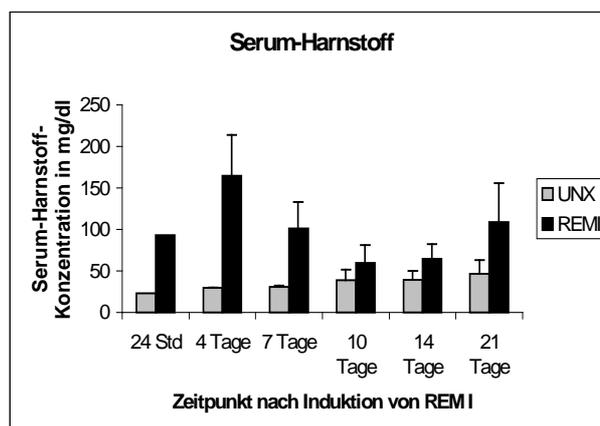


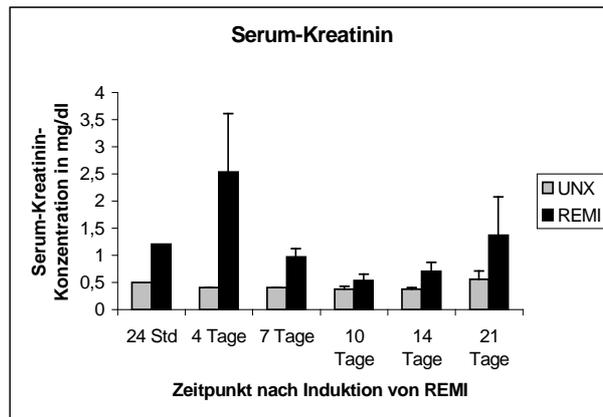
UNX 24 Stunden (7), Tubulointerstitium, Paraffinschnitt, 400x

5.3 Serum-Analysen bestätigen die Nierenschädigung

Das Serum wurde am Tag der Organentnahme gewonnen, um den induzierten Nierenschaden auch laborchemisch durch den Anstieg der Retentionsparameter Harnstoff und Kreatinin zu sichern. Da nicht von allen Tieren Serum verfügbar war, konnte eine exakte statistische Auswertung nicht erfolgen. Jedoch zeigte sich bei den REMI-Tieren ein starker Anstieg der Retentionsparameter bereits 24 Stunden nach Induktion von REMI, der einen maximalen Wert am Tag 4 erreichte. Bis zum Tag 10 kam es zu einer vorübergehenden Erholung der Nierenfunktion, die sich jedoch ab Tag 14 erneut stetig verschlechterte. Bei den UNX-Tieren konnte keine wesentliche Einschränkung der Nierenfunktion festgestellt werden (s. Abb. 5).

Abbildung 5: Serum-Harnstoff und Serum-Kreatinin

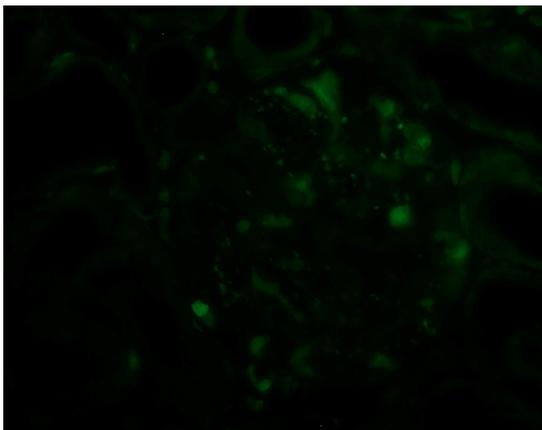




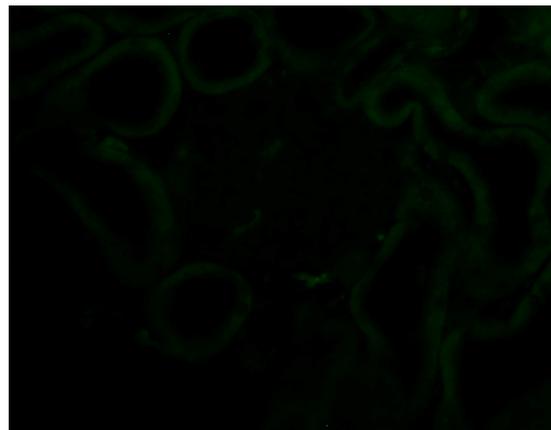
5.4 Knochenmarkszellen wandern in die Niere von REMI-Tiere ein

Bereits fluoreszenzmikroskopisch ließ sich eine starke Infiltration von EGFP⁺-Zellen aus dem Knochenmark in die Glomeruli von REMI-Tieren nach Induktion der Erkrankung feststellen (s. Abb. 6). In den Glomeruli von UNX-Tiere konnten weit weniger EGFP⁺-Zellen nachgewiesen werden.

Abbildung 6: Infiltration von EGFP⁺- Zellen fluoreszenzmikroskopisch



REMI 4 Tage (37), Glomerulum, Gefrierschnitt, 400x



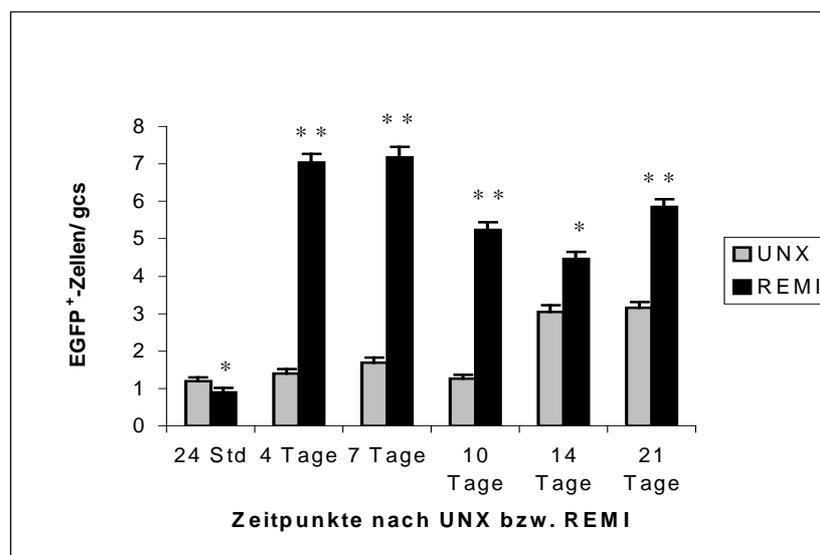
UNX 4 Tage (8), Glomerulum, Gefrierschnitt, 400x

Eine genauere Quantifizierung gelang mithilfe des konfokalen Mikroskops. Mithilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz

wurden die Ergebnisse auf Signifikanz bezüglich des Unterschieds in der Anzahl infiltrierender EGFP⁺-Zellen zwischen REMI- und UNX-Tieren geprüft. Alle Ergebnisse erwiesen sich als signifikant, überwiegend sogar als hochsignifikant (s. Abb. 7). In Abbildung 7 sind die Mittelwerte in der Anzahl der in die Glomeruli infiltrierender EGFP⁺-Zellen zu allen Untersuchungszeitpunkten pro glomerulärem Querschnitt (gcs = 10 µm) dargestellt.

Auch in allen folgenden Diagrammen ist die Zellzahl pro gcs angegeben. Die Fehlerindikatoren geben in diesem wie auch in den folgenden Diagrammen positive sowie negative Abweichungen als Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) an. Alle Quantifizierungen wurden verblindet durchgeführt.

Abbildung 7: Anzahl infiltrierender EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum *



** p < 0,01 vs. UNX; * p < 0,05 vs. UNX

* Bei der Zählung EGFP⁺-Zellen wurde anfangs teilweise nur die Gesamtzahl bestimmt, so dass die Standardabweichungen fehlten. Diese konnten jedoch aus anderen Zählungen des jeweils gleichen Tieres übernommen werden (z.B. aus der ED-1-Färbung mit paralleler Zählung aller EGFP⁺-Zellen). Auch war in jeder Gruppe mindestens ein Tier mit korrekt bestimmbarer Standardabweichung vorhanden. Diese stimmte mit der aus den anderen Zählungen übernommenen Standardabweichung sehr gut überein.

Einen Tag nach Induktion von REMI war kein großer Unterschied bezüglich der Infiltration von EGFP⁺-Zellen in die Niere zwischen UNX- und REMI-Tieren erkennbar. Dies änderte sich ab Tag 4: Bei den REMI-Tieren kam es zu einer massiven Rekrutierung von Knochenmarkszellen in die Glomeruli mit im Mittel 7 EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum. Diese Zellzahl bestand unverändert am Tag 7. An diesen beiden Tagen fanden sich die größten Unterschiede zwischen REMI- und UNX-Tieren mit einer 5-fach bzw. 4-fach höheren Anzahl EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum bei den REMI-Tieren.

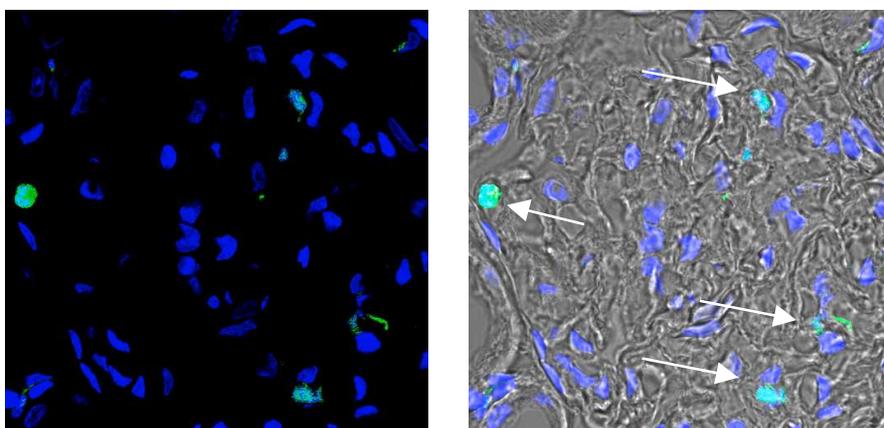
Von Tag 7 bis Tag 14 kam es bei den REMI-Tieren zu einer leichten Abnahme der Zahl infiltrierender EGFP⁺-Zellen auf einen Wert von 4,5. Bei den UNX-Tieren hingegen kam es zu einer Zunahme der bis zum Tag 14 konstant niedrigen Zellzahl auf 3,1 EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum. Am Tag 14 findet sich daher die größte Annäherung der Zahlen EGFP⁺-Zellen zwischen beiden Tiergruppen.

Am Tag 21 kam es erneut zu einem leichten Anstieg der Zahl EGFP⁺-Zellen bei den REMI-Tieren auf etwa 5,8.

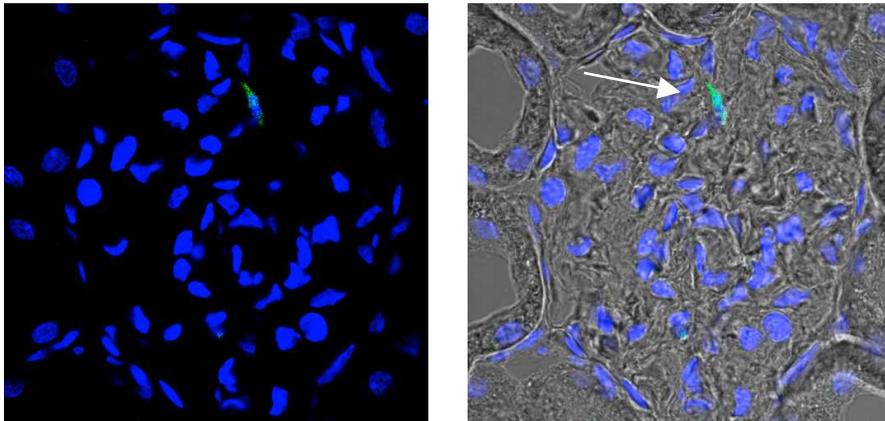
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass - abgesehen vom ersten Untersuchungszeitpunkt - die Anzahl EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum bei den REMI-Tieren stets deutlich höher lag als bei den UNX-Tieren und dass die Infiltration EGFP⁺-Zellen zweigipflig verläuft.

Konfokale Bilder der Infiltration EGFP⁺-Zellen zeigt Abbildung 8.

Abbildung 8: Infiltration von EGFP⁺- Zellen konfokal



REMI 10 Tage (63), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630x, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast

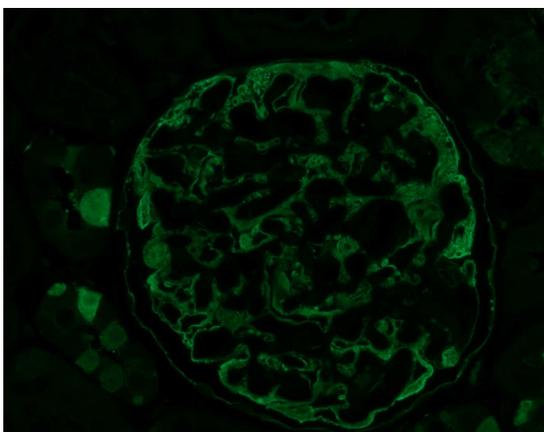


UNX 10 Tage (4), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630x, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast

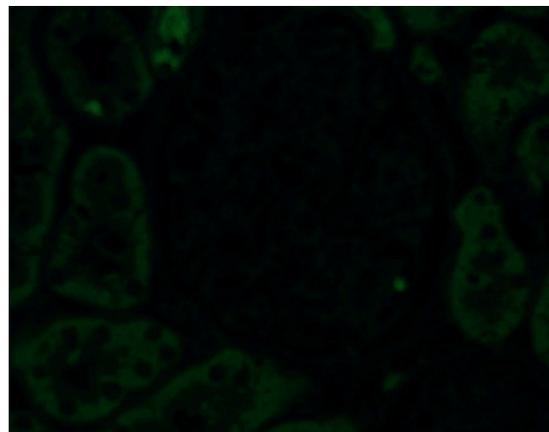
5.5 Die Proliferationsrate bei REMI-Tieren ist gesteigert

Die Etablierung der EGFP-Färbung war notwendig, um die EGFP-Fluoreszenz nach Zerstörung durch Citratpuffer pH 6,1 als Antigendemaskierungsmethode bei der PCNA-Färbung wieder herzustellen. Am Fluoreszenzmikroskop zeigte sich der Erfolg der EGFP-Färbung in der Wiederherstellung der EGFP-Fluoreszenz. Die Negativ-Kontrolle zeigte nur wenig erhaltene EGFP-Fluoreszenz (s. Abb. 9).

Abbildung 9: Erfolgreiche Färbung von EGFP



EGFP-Ratte (100), Glomerulum, Paraffinschnitt 400x

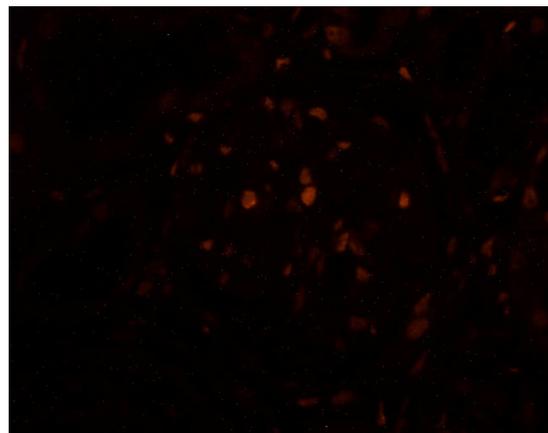
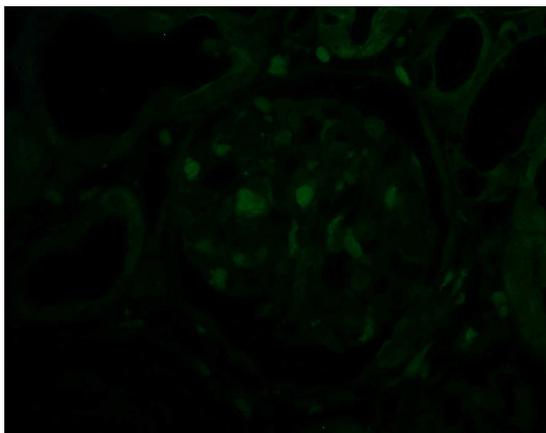


EGFP-Ratte (100), Glomerulum, Negativ-Kontrolle, Paraffinschnitt, 400x

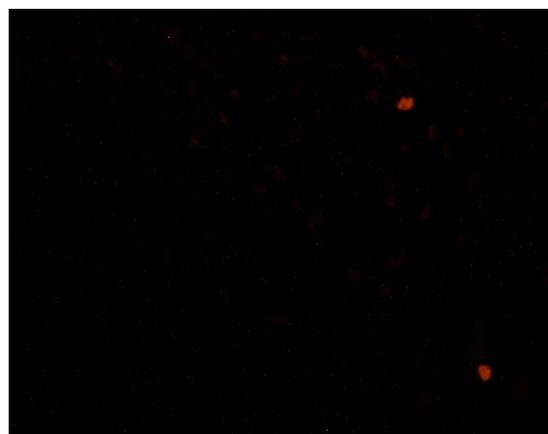
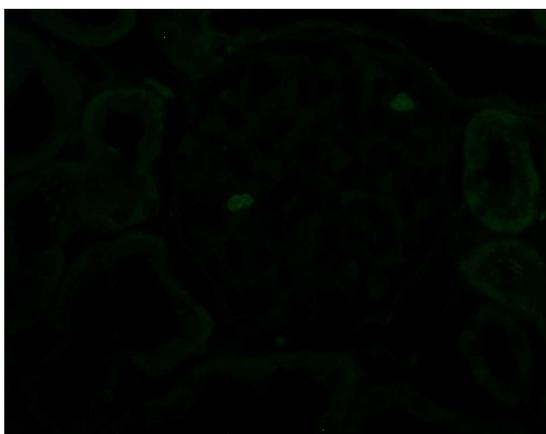
Mithilfe der PCNA-Färbung sollte überprüft werden, ob eingewanderte EGFP⁺-Zellen in der Niere proliferierten und somit an der Regeneration der Niere nach akuter Schädigung beteiligt sein könnten. Die Untersuchung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch und war auf qualitative Ergebnisse ausgerichtet. Abgebildet sind dieselben Areale des gleichen Glomerulums in der EGFP-Färbung und der PCNA-Färbung (s. Abb. 10). Eine Quantifizierung wurde nicht durchgeführt.

Bei REMI-Tieren wurden im Vergleich zu UNX-Tieren am Tag 4 nach Induktion von REMI glomerulär sowohl mehr proliferierende EGFP⁺-Zellen aus dem Knochenmark (EGFP⁺-PCNA⁺-Zellen) als auch mehr proliferierende Zellen, die nicht dem Knochenmark entstammten (EGFP⁻-PCNA⁺-Zellen), nachgewiesen.

Abbildung 10: Darstellung der Doppelfärbung von PCNA und EGFP



REMI 4 Tage (37), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x, links: EGFP, rechts: PCNA



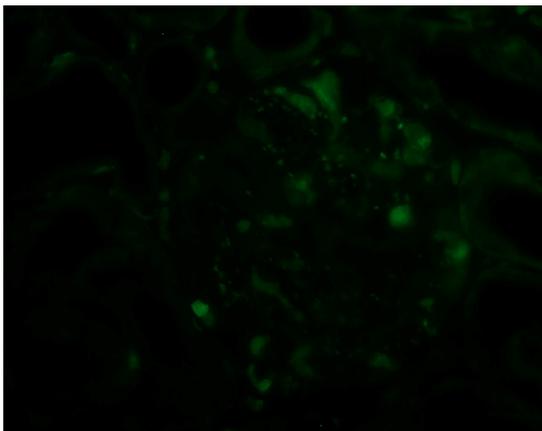
UNX 4 Tage (8), Glomerulum, Paraffinschnitt, 400x, links: EGFP, rechts: PCNA

5.6 Die Mehrzahl der einwandernden Knochenmarkszellen sind Makrophagen

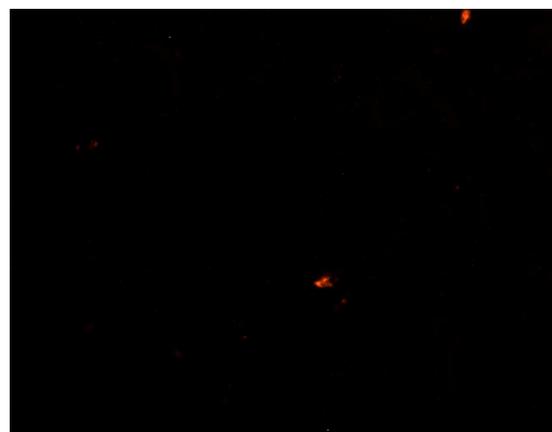
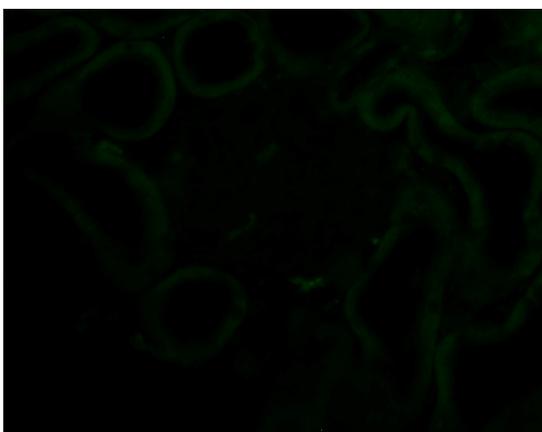
Die ED-1-Färbung diente dem Nachweis von Makrophagen, einer Untergruppe von Leukozyten, die mittels Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinsekretion bei Entzündungen eine wichtige Rolle spielen.

Am Tag 4 nach Induktion von REMI trat die um ein Vielfaches höhere Anzahl an Makrophagen bei REMI-Tieren im Vergleich zu UNX-Tieren deutlich hervor. Auch ließ sich bereits fluoreszenzmikroskopisch eine hohe Anzahl von Ko-Lokalisationen zwischen EGFP⁺-Zellen und Makrophagen (EGFP⁺-ED-1⁺-Zellen) vermuten (s. Abb. 11).

Abbildung 11: Infiltration ED-1⁺- Zellen, fluoreszenzmikroskopisch



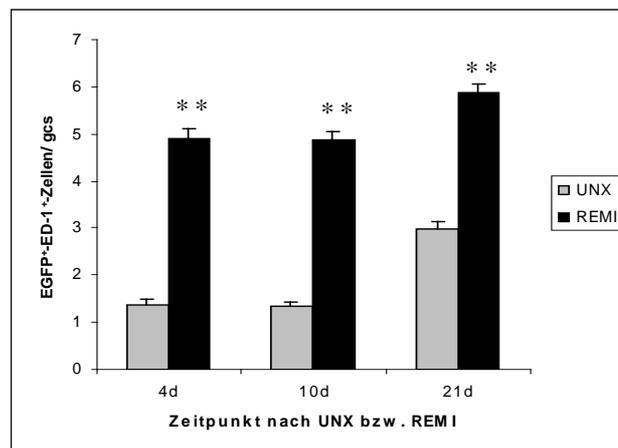
REMI 4 Tage (37), Glomerulum, Gefrierschnitt, 400x, links: EGFP, rechts: ED-1



UNX 4 Tage (8), Glomerulum, Gefrierschnitt, 400x, links: EGFP, rechts: ED-1

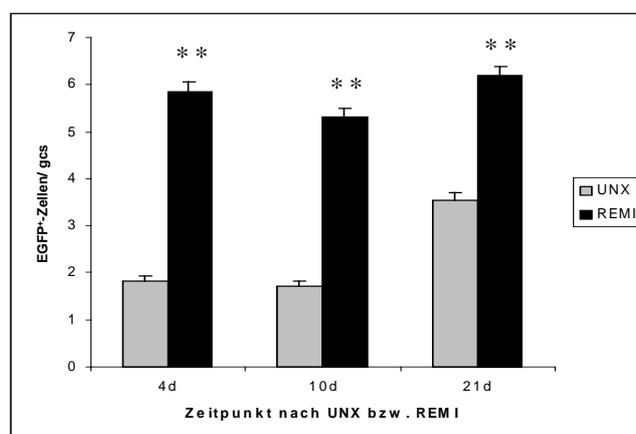
Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde von allen Tieren der Tage 4, 10 und 21 nach Induktion von REMI eine Quantifizierung und Ko-Lokalisationsuntersuchung am Konfokalen Mikroskop durchgeführt. Mithilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz wurden die Ergebnisse auf Signifikanz bezüglich eines Unterschieds in der Anzahl EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen zwischen REMI- und UNX-Tieren geprüft. Alle Ergebnisse erwiesen sich als hochsignifikant (s. Abb. 12).

Abbildung 12: Anzahl infiltrierender EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen pro Glomerulum



** p < 0,01 vs. UNX

Abbildung 13: Parallele Zählung EGFP⁺- Zellen pro Glomerulum

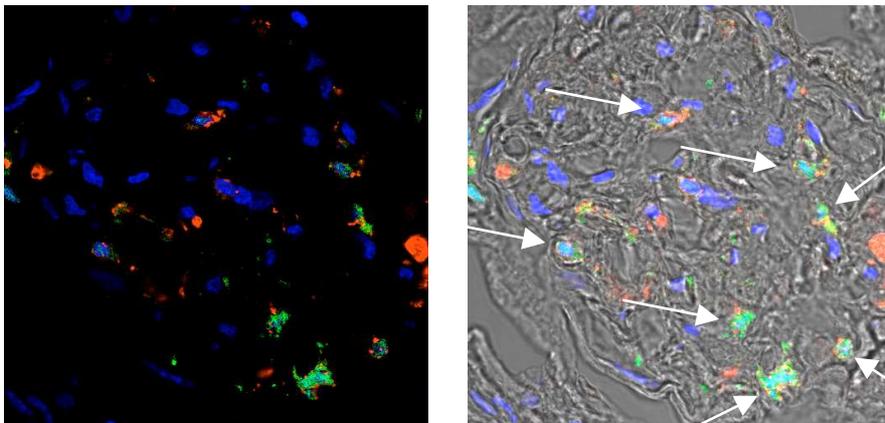


** p < 0,01 vs. UNX

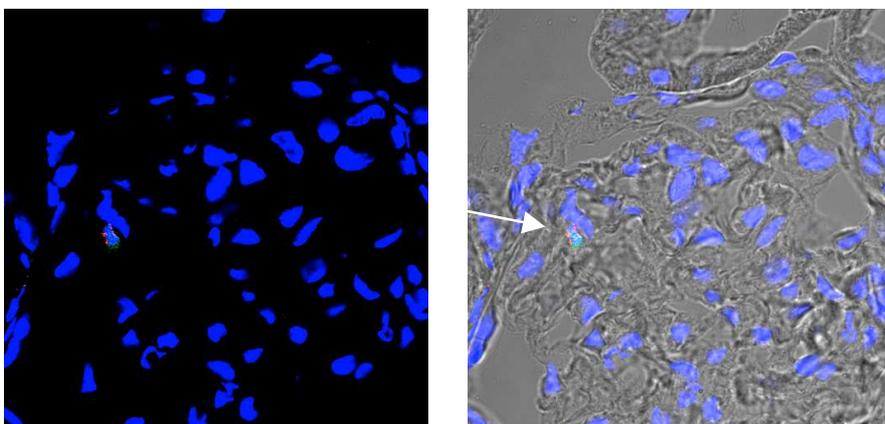
Am Tag 4 nach Induktion von REMI zeigte sich eine etwa 3,5-fach höhere Anzahl EGFP⁺-ED-1⁺-Zellen aus dem Knochenmark (EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen) bei REMI- im Vergleich zu den UNX-Tieren: im Mittel etwa 4,9 EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen pro Glomerulum bei den REMI-Tieren und etwa 1,4 EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen bei den UNX-Tieren. Am Tag 10 kam es diesbezüglich zu keinen Veränderungen. In beiden Tiergruppen zeigte sich jedoch am Tag 21 ein Anstieg in der Anzahl infiltrierender EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen, bei den UNX-Tieren stärker als bei den REMI-Tieren. Daher reduzierte sich das Verhältnis in der Anzahl EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen von 3,5-fach am Tag 4 auf 2-fach am Tag 21 (s. Abb. 12).

Konfokale Bilder von infiltrierenden EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen zeigt Abbildung 14.

Abbildung 14: EGFP⁺-ED-1⁺- Makrophagen konfokal



REMI 10 Tage (79), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630x, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast

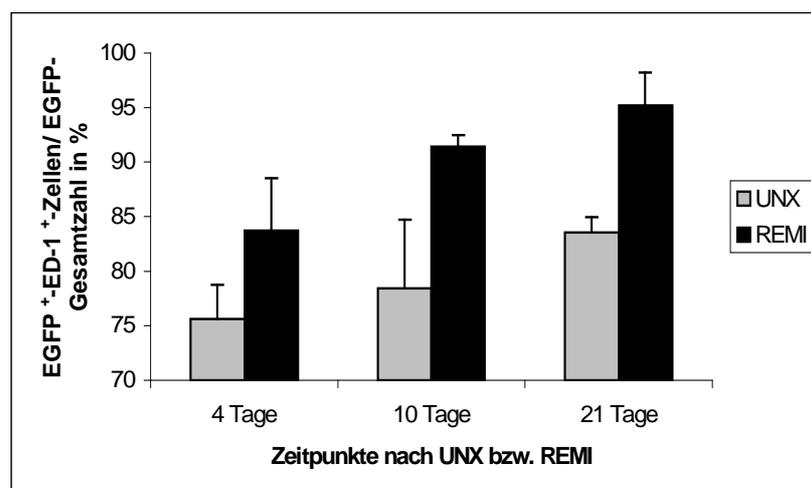


UNX 10 Tage (4), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630x, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast

Da parallel zur Zählung EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen die Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen im jeweils gleichen Glomerulum bestimmt wurde (s. Abb. 13), lässt sich eine Aussage über den prozentualen Anteil von knochenmarksentstammenden Makrophagen an allen sich im Glomerulum befindlichen Knochenmarkszellen treffen. So steigt der Anteil EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen an allen EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum bei den REMI-Tieren fast linear an, von knapp 84 % am Tag 4, über 91,5 % am Tag 10 und 95 % am Tag 21 (s. Abb. 15). Parallel lässt sich auch bei den UNX-Tieren ein ähnlicher Anstieg des prozentualen Anteils feststellen.

Dabei ist zu beachten, dass es sich hier um prozentuale Anteile von EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen an der Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum handelt. Aus diesem Grund kommt es trotz gleicher absoluter Zellzahl an EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen am Tag 4 und 10 (s. Abb. 12) zu unterschiedlichen Prozentanteilen (s. Abb. 15), da die Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen am Tag 4 höher ist als am Tag 10.

Abbildung 15: Prozentualer Anteil EGFP⁺- Makrophagen an EGFP⁺-Zellen

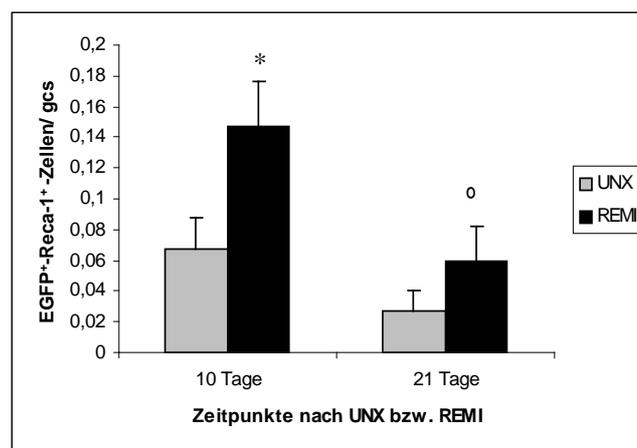


5.7 Ein Endothelzellersatz findet in geringem Maße statt

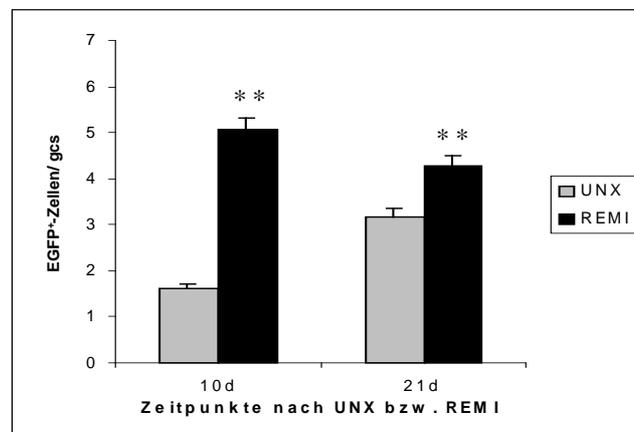
Die Reca-1-Färbung diente dem Nachweis von Endothelzellen, die im REMI-Modell die primär geschädigten Zellen darstellten.

Am Tag 21 zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch bei den REMI-Tieren eine leicht rarefizierte Gefäßzeichnung. Es wurde der Eindruck gewonnen, dass Ko-Lokalisationen von EGFP⁺- und Reca-1⁺-Zellen in geringer Zahl existieren könnten. Sowohl bei den UNX- wie auch den REMI-Tieren konnten diese Beobachtungen gemacht werden. Zur genaueren Untersuchung und Quantifizierung dieser vermeintlichen Ko-Lokalisationen wurden alle Tiere von Tag 10 und 21 nach Induktion von REMI am Konfokalen Mikroskop studiert. Mithilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben mit ungleicher Varianz wurden die Ergebnisse auf Signifikanz hinsichtlich eines Unterschieds in der Existenz EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen zwischen REMI- und UNX-Tieren geprüft. Die Ergebnisse am Tag 10 erwiesen sich als signifikant, die Ergebnisse am Tag 21 hingegen waren nicht signifikant (s. Abb. 16).

Abbildung 16: Anzahl EGFP⁺-Reca-1⁺- Endothelzellen pro Glomerulum



* $p < 0,05$ vs. UNX; ⁰ $p > 0,05$ vs. UNX

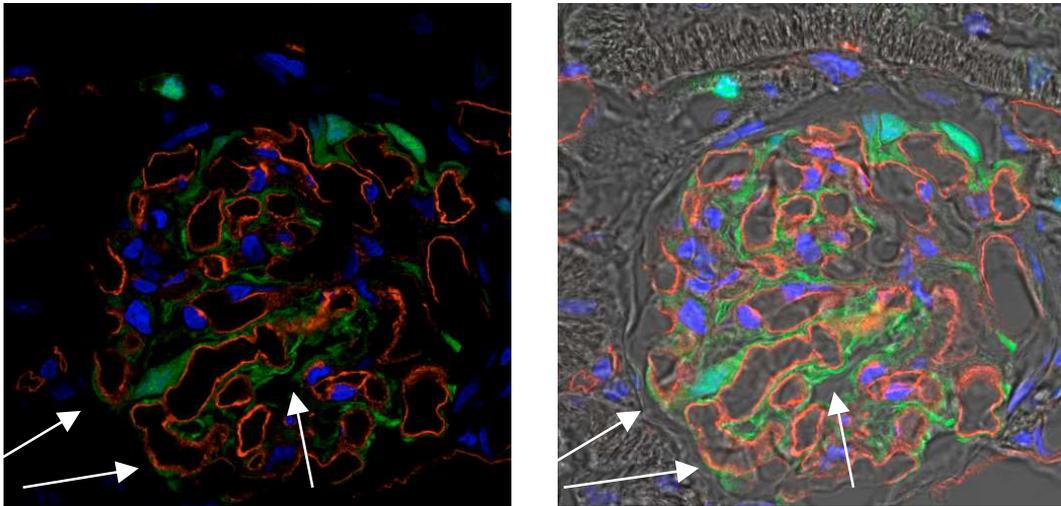
Abbildung 17: Parallele Zählung EGFP⁺- Zellen pro Glomerulum

*** p < 0,01 vs. UNX

Am Tag 10 waren in den Nieren von REMI-Tieren doppelt so viele EGFP⁺-Reca-1⁺-Zellen (EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen) nachweisbar wie in den Nieren von UNX-Tieren: im Mittel 0,15 EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen pro Glomerulum gegenüber 0,07 EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen. Am Tag 21 nahm die Zahl an Ko-Lokalisationen in beiden Gruppen proportional ab, bei den REMI-Tieren waren im Mittel noch 0,06 EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen pro Glomerulum und bei den UNX-Tieren 0,03 nachzuweisen (s. Abb. 16).

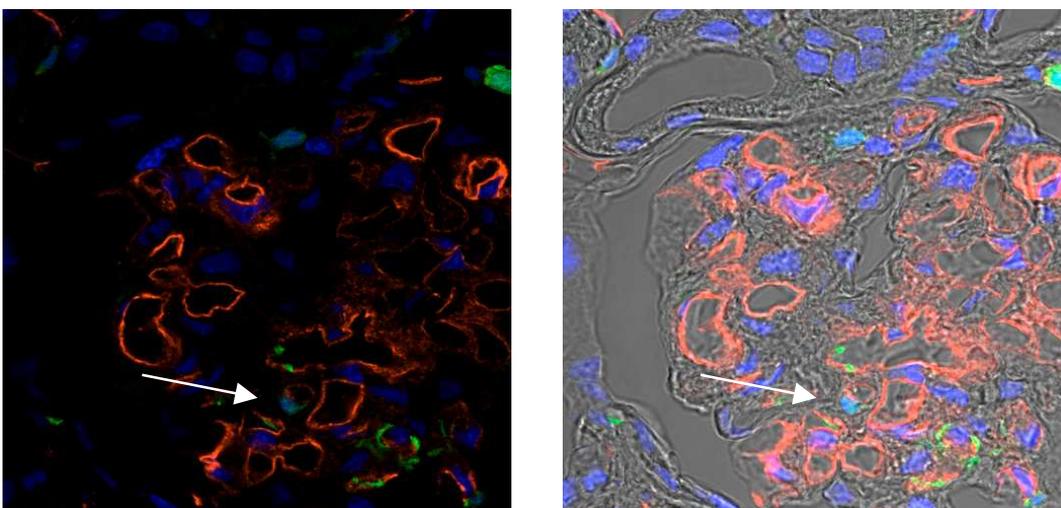
Eine jeweils parallele Bestimmung der Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum (s. Abb. 17) wurde auch hier durchgeführt.

Als Grundlage bei der Analyse von Ko-Lokalisationen diene das Fluoreszenzmuster der Reca-1-Färbung bei EGFP-transgenen Tieren, ein konfokales Bild ist in Abbildung 18 dargestellt. Aufgrund der EGFP-Transgenität exprimieren hier prinzipiell alle Zellen cytoplasmatisch EGFP. Zu beachten ist, dass EGFP⁺-Reca-1⁺- Endothelzellen nicht durch Fluoreszenzüberlagerungen und konsekutive Farbänderung erkennbar sind, da Reca-1 membranös und EGFP cytoplasmatisch exprimiert wird.

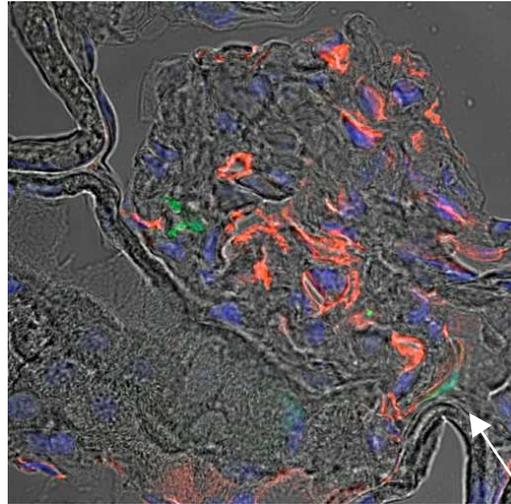
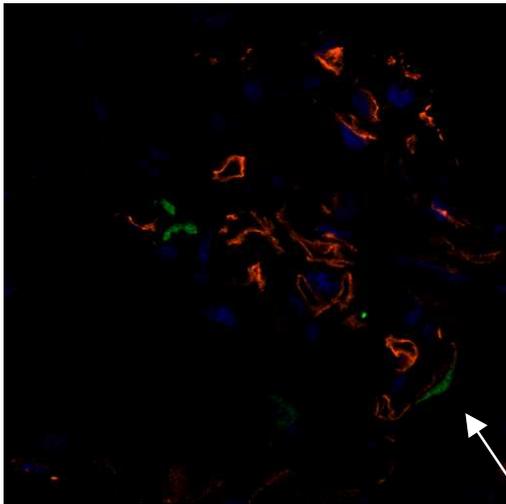
Abbildung 18: EGFP⁺-Reca-1⁺- Endothelzellen konfokal bei EGFP-transgenen Wistarratten

EGFP-transgene Wistarratte, Glomerulum, Gefrierschnitt, 630-fach, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast

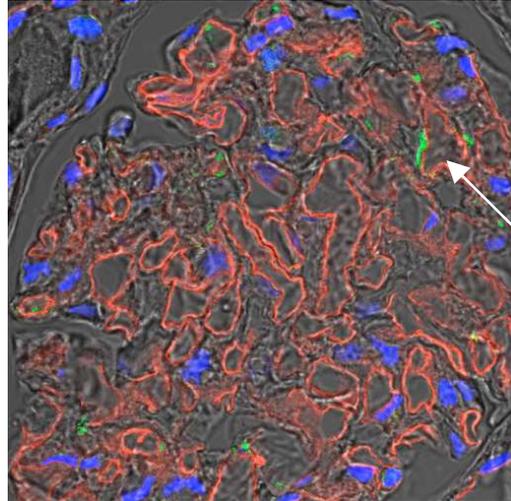
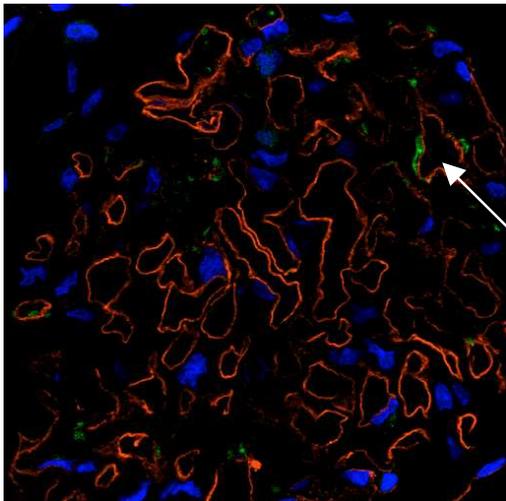
Konfokale Bilder von EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen bei REMI- und UNX-Tieren der Tage 10 und 21 zeigt Abbildung 19.

Abbildung 19: EGFP⁺-Reca-1⁺- Endothelzellen konfokal

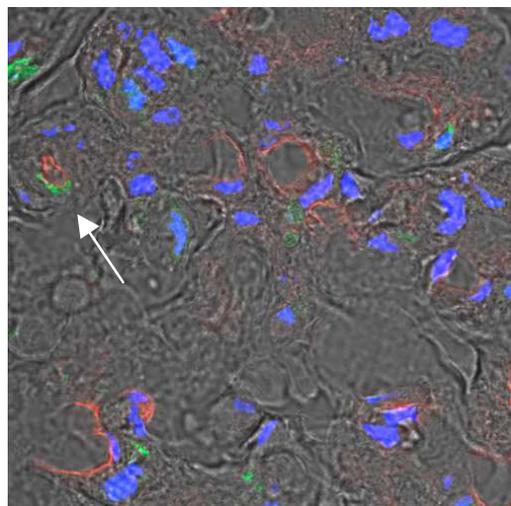
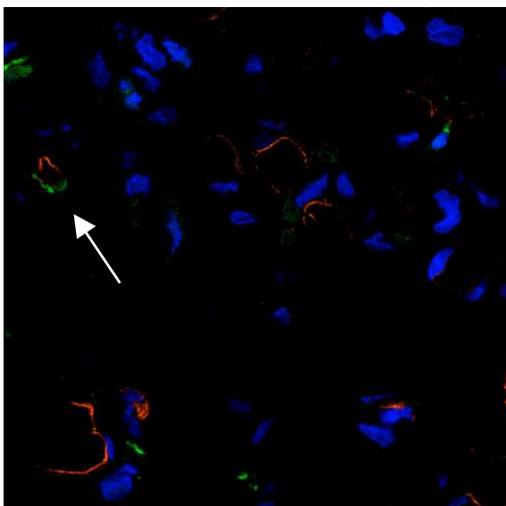
REMI 10 Tage (79), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630-fach, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast



UNX 10 Tage (14), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630-fach, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast



REMI 21 Tage (35), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630-fach, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast



UNX 21 Tage (18), Glomerulum, Gefrierschnitt, 630-fach, Zoom 1,3; rechts mit Phasenkontrast

Da der Großteil an einwandernden Knochenmarkszellen Makrophagen waren (s. Kapitel 5.6, s. Abb. 15), interessierte besonders, welcher Anteil an EGFP⁺-ED-1⁻-Zellen (Zellen, die dem Knochenmark entstammen, aber nicht Makrophagen sind) pro Glomerulum, den Endothelzellmarker Reca-1 exprimierten. Dazu wurde folgende Rechnung durchgeführt:

Beispiel für UNX 10 Tage:

78,5 % aller EGFP⁺-Zellen sind ED-1⁺-Zellen (s. Abb. 15)

21,5 % aller EGFP⁺-Zellen sind ED-1⁻-Zellen (folgt aus Abb. 15)

21,5 % von 1,61 (s. Abb.17) = 0,35

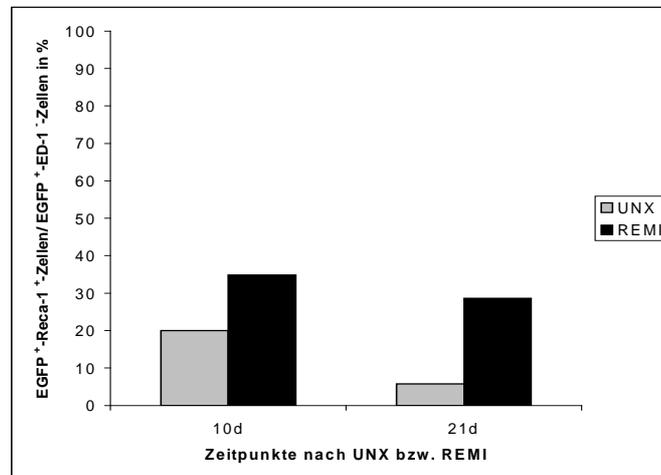
0,35 Zellen pro Glomerulum sind EGFP⁺-ED-1⁻-Zellen

0,07 Zellen pro Glomerulum sind EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen (s. Abb. 16)

Ergebnis: $0,07 / 0,35 \times 100 = 20 \%$

d.h. ca. 20 % der einwandernden Knochenmarkszellen, die nicht Makrophagen waren, exprimierten bei den UNX-Tieren am Tag 10 in den Endothelzellmarker Reca-1. Dies konnte als Hinweis auf Transdifferenzierungen gewertet werden.

Die Berechnung der UNX-Tiere von Tag 21 sowie der REMI-Tiere von Tag 10 und 21 erfolgte analog (s. Abb. 20).

Abbildung 20: Prozentualer Anteil EGFP⁺-Reca-1⁺- Endothelzellen an EGFP⁺-ED-1⁻- Zellen *

Als Hinweis auf stattgefunden Transdifferenzierungen des Nicht-Makrophagen-Anteils an EGFP⁺-Zellen in Endothelzellen ließ sich Folgendes feststellen: Am Tag 10 exprimierten bei den UNX-Tieren ca. 20 % des Nicht-Makrophagen-Anteils an EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum den Endothelzellmarker Reca-1, bei den REMI-Tieren ca. 35 %. Am Tag 21 betrug die Zahl ca. 6 % bei den UNX-Tieren und ca. 28,5 % bei den REMI-Tieren.

* Auf die Angabe eines Fehlerindicators wurde verzichtet, da es aufgrund mehrerer Rechenschritte zur Fehlerfortpflanzung kommt. Betrachtet man einzelne Tiere einer Tiergruppe ergibt sich jedoch ein Fehlerintervall in der Größenordnung von 5 %.

6 Diskussion der Ergebnisse

Ein erstes Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die erfolgreiche Knochenmarkstransplantation zu verifizieren. Hierzu wurden Blutausstriche angefertigt und auf EGFP⁺-Zellen untersucht (s. Kap. 5.1.1). Bei gelungener Transplantation stellten sich Leukozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop als EGFP⁺, grün fluoreszierende Zellen dar (Hakamata et al. 2001). EGFP⁺-Zellen konnten nur aus dem Knochenmark der Spendertiere stammen, denn nur sie waren EGFP-transgen. Später wurden zur Bestätigung der Blutausstriche mit gleicher Zielsetzung FACS-Analysen durchgeführt, die einen EGFP-Chimärismus von im Mittel 87% nach Transplantation zeigten (s. Kap. 5.1.2). In der Literatur finden sich ähnliche EGFP-Chimärismusraten (Duffield et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass die von uns durchgeführte Knochenmarkstransplantation erfolgreich war.

Ein zweites wichtiges Ziel war es, die erfolgreiche Induktion der REMI-Erkrankung nachzuweisen. Dieses gelang durch die PAS-Färbung (s. Kap. 5.2.1), die Kaninchen-IgG-Färbung (s. Kap. 5.2.2) sowie durch den Anstieg der Retentionsparameter Kreatinin und Harnstoff im Serum (s. Kap. 5.3). Die Histologie zeigte in der PAS-Färbung pathologische Veränderungen und Umbauten der Nieren von REMI-Tieren im Sinne von Fibrinthromben, geschwollenen Endothelzellen, zunehmender Sklerosierung und Tubulusatrophie. Dieses steht in Einklang mit den histologischen Veränderungen in anderen Tiermodellen zum spezifischen Endothelzellschaden (Nangaku et al. 1997, Hohenstein et al. 2007). Der anti-Endothelzell-Antikörper, der den REMI-Tieren appliziert worden war, zeigte ein lineares Bindungsmuster entlang der Gefäßendothelien, wodurch - übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der PAS-Färbung - die erfolgreiche Induktion der REMI-Erkrankung gezeigt werden konnte. Der schwache bis fehlende Nachweis spezifischer Fluoreszenz ab Tag 10 nach Induktion von REMI ist wahrscheinlich durch enzymatischen Abbau des zuvor gebundenen Antikörpers und Absterben

von Endothelzellen – auch in der PAS-Färbung sichtbar – bedingt. Dies lässt sich nach ähnlichem Zeitintervall auch in der Literatur finden (Nangaku et al. 1997).

In unserem REMI-Modell kam es auch nach acht Wochen nicht zu einer Resolution des induzierten Nierenschadens. Im REMI-Modell von Nangaku et al., in dem der Endothelzellschaden ebenfalls durch selektive Perfusion der Nierenarterie mit einem anti-Endothelzell-Antikörper hervorgerufen wurde, kam es zu einer Fibrosierung des Tubulointerstitiums, die auch nach 10 Tagen noch bestand. Auch wenn es in diesem Modell nicht zur vollständigen Ausheilung des Nierenschadens kam, wiesen jedoch 50% der Glomeruli nach 10 Tagen eine normale Histologie auf (Nangaku et al. 1997). Hierbei ist zu beachten, dass die Ratten bei Nangaku et al. keiner letalen Bestrahlung mit nachfolgender Knochenmarkstransplantation unterzogen worden waren, da die Rolle des Knochenmarks in ihrer Studie nicht Gegenstand der Untersuchung war (Nangaku et al. 1997). Dies, sowie mögliche Unterschiede im Bindungsverhalten des von uns verwendeten Antikörpers, könnte zu veränderten Reaktionsmechanismen mit konsekutiv eingeschränkter Regenerationsfähigkeit geführt haben.

EGFP diene in unserer Studie als Marker für Zelllinien aus dem Knochenmark. Das Green Fluorescent Protein wurde 1961 bei Untersuchungen zur Biolumineszenz der Qualle *Aequorea victoria* von Osamu Shimomura entdeckt (Shimomura 2006). Nur wenige Jahrzehnte später ist GFP ein etabliertes Werkzeug zur noninvasiven Untersuchung intrazellulärer Genexpression, Proteinlokalisierung sowie Zelllinienzugehörigkeit lebender pro- sowie eukaryontischer Zellen geworden (Patterson et al. 1997). Aufgrund der enormen Relevanz für die Wissenschaft wurde der diesjährige Nobelpreis für Chemie an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien für die Entdeckung und Weiterentwicklung von GFP vergeben (Nobel Foundation 2008, Dambeck 2008).

Der große Vorteil von GFP liegt darin, dass es ohne besondere Hilfsmittel detektiert werden kann. Heute existieren verschiedene durch Mutation entstandene GFP-Varianten, die sich u.a. in Hinblick auf Fluoreszenzintensität, pH- und Temperaturstabilität und Photobleaching unterscheiden (Patterson et al. 1997). Die in dieser Promotion genutzte Variante ist das EGFP, das sich besonders gut für Konfokale Untersuchungen eignet, da es u.a. bei seinem Exzitationsmaximum von 488 nm sechsmal heller leuchtet als das Wildtyp-GFP, was eine bessere Diskriminierung von Autofluoreszenz erlaubt (Patterson et al. 1997). In unseren Versuchen wurde den Empfänger-Wistarratten das Knochenmark EGFP-transgener Ratten transplantiert, folglich mussten alle EGFP⁺-Zellen, die bei REMI- und UNX-Tieren in die Niere einwanderten, dem transplantierten Knochenmark entstammen und konnten auf diese Weise verfolgt werden.

Die Bestimmung der Anzahl EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum lieferte signifikant höhere Zellzahlen bei REMI- im Vergleich zu UNX-Tieren (s. Abb. 7). Bei den REMI-Tieren kam es zu einer Zunahme der glomerulären Zahl EGFP⁺-Zellen um den Faktor 8,5 zwischen dem Induktionstag von REMI und 7 Tage nach Induktion, der bis zum Tag 21 auf 6,5 absank. Die beschriebene Rekrutierung von Knochenmarkszellen als Antwort auf eine akute Nierenschädigung findet sich auch in der Literatur (Ito et al. 2001, Rookmaaker et al. 2003, Ikarashi et al. 2005). So konnten Ito et al. im ATM-Modell unter Verwendung von EGFP-chimären Ratten eine Zunahme an glomerulären EGFP⁺-Zellen um den Faktor 5 zwischen dem Induktionstag der anti-Thy1.1-Glomerulonephritis und 7 Tage nach Induktion nachweisen. Auch nach acht Wochen, als sich die glomeruläre Struktur wieder normalisiert hatte, fanden die Autoren noch die 4-fache Zahl EGFP⁺-Zellen im Vergleich zum Induktionstag (Ito et al. 2001).

Der in Abbildung 7 der vorliegenden Dissertation gezeigte Verlauf der Infiltration EGFP⁺-Zellen bei den REMI-Tieren beruht im Wesentlichen auf einer Infiltration von Entzündungszellen (s. Abb. 12 und 15). Eine Makrophageninfiltration nach glomerulärer Schädigung der Niere ist häufig (Radounikli et al. 1995) und spielt eine Rolle bei der Progression von Nephropathien zu Glomerulosklerose (Wolf

et al. 1997, Li et al. 2006). In dem in dieser Promotionsarbeit verwendeten REMI-Modell konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Infiltration von Entzündungszellen auf die Up-Regulation bestimmter chemotaktischer Chemokine zurückzuführen ist. Eine Up-Regulation des Chemokins MCP-1/CCL2 in glomerulären und peritubulären Endothelzellen führte dabei zu einer Makrophagen-Infiltration sowohl in Glomeruli als auch ins Tubulointerstitium (Panzer et al. 2006). Analog zu unseren Ergebnissen findet sich auch in der Literatur die Infiltration von Makrophagen in geschädigte Glomeruli (Hohenstein et al. 2007, Rookmaaker et al. 2003, Ito et al. 2001, Nangaku et al. 1997). Diese Infiltration von Entzündungszellen könnte durch die signifikante Zunahme apoptotischer Zellen nach Induktion eines Endothelzellschadens (Hohenstein et al. 2007) verursacht werden. Makrophagen sind durch ihre Phagozytosefähigkeit in der Lage, solche apoptotischen Zellen abzubauen (Welsch 2003).

In Abbildung 15 wird deutlich, dass der Anteil von EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen an allen EGFP⁺-Zellen von 84 % am Tag 4 bis auf 95 % am Tag 21 kontinuierlich ansteigt - ein Indiz dafür, dass zu frühen Zeitpunkten noch ein anderer Zelltypus an der Entzündungsreaktion beteiligt ist, diese zum späteren Zeitpunkt jedoch nahezu vollständig von Makrophagen getragen wird. Dabei kann vermutet werden, dass zu frühen Zeitpunkten neben Makrophagen vor allem neutrophile Granulozyten in die Niere einwandern. Eine solche Einwanderung von Neutrophilen in der Initialphase nach Induktion eines spezifischen Endothelzellschadens wurde in der Literatur beschrieben (Hohenstein et al. 2007, Johnson et al. 1988). Im Verlauf der Erkrankung könnte ein Rückgang in der Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten sowohl die geringere Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen zwischen Tag 7 und 14 als auch die Zunahme des relativen Anteils von Makrophagen an der Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen erklären.

Der erneute Anstieg in der Zahl EGFP⁺-Zellen ab Tag 14 ist zu 95 % monozytär. Dieser monozytäre Zellinflux unterhält die Entzündungsreaktion und ist wahrscheinlich zum Abbau apoptotischer Zellen notwendig.

Rookmaaker et al. konnten in ihren Studien ebenfalls eine signifikante Zunahme an knochenmarksentstammenden, glomerulären Makrophagen nach Induktion der anti-Thy1.1-Glomerulonephritis feststellen (Rookmaaker et al. 2003). Ito et al. fanden im gleichen Modell, dass 7 Tage nach Induktion der Glomerulonephritis ca. 30 % aller glomerulären EGFP⁺-Zellen auch ED-1⁺ waren (Ito et al. 2001), bei uns waren es über 80 %. Dieses und auch die Tatsache, dass es im Gegensatz zum REMI-Modell bei Ito et al. nach acht Wochen zu einer Normalisierung der glomerulären Struktur kam, sprechen dafür, dass der durch REMI hervorgerufene Nierenschaden ein anderer ist als der der anti-Thy-1.1-Glomerulonephritis.

Bei den UNX-Tieren könnte die im Vergleich zu Tag 10 doppelt so hohe Anzahl EGFP⁺-Zellen am Tag 14 und 21 durch die Uninephrektomie, die zu tiefgreifenden Veränderungen im Organismus führt, alleinig verursacht worden sein. Ein Ausfall oder Wegfall gesunder Glomeruli, wozu es bei einer Uninephrektomie kommt, führt zu Hyperfiltration in der verbleibenden Niere, die über verschiedene Mediatoren mit einer Hypertrophie und Hyperplasie gesunder Glomeruli einhergeht (Herold 2008). Die damit verbundenen Schädigungen führen zum Zelluntergang. Die steigende Anzahl EGFP⁺-Zellen könnte somit als Reaktion auf die Uninephrektomie mit notwendigem Abbau apoptotischer Zellen gewertet werden. Dazu passen die Ergebnisse der ED-1-Färbung: Hier konnte eine Zunahme der absoluten Zahl EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen und eine Zunahme des prozentualen Anteils EGFP⁺-ED-1⁺-Makrophagen an der Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen von 76 % am Tag 4 auf 84 % am Tag 21 konstatiert werden.

Die Glomeruli kranker Tiere wiesen vier Tage nach Induktion von REMI eine gesteigerte Proliferationsrate auf (s. Abb. 10). Nur ein Teil dieser proliferierenden Zellen war EGFP⁺ und kam somit aus dem Knochenmark. Hohenstein et al. konnten in ihrem durch Perfusion von Con A und anti-Con A induzierten Modell mit Endothelzellschädigung nach drei Tagen ebenfalls eine solche gesteigerte Proliferationsrate glomerulärer Zellen beobachten

(Hohenstein et al. 2007). Nangaku et al. zeigten, dass der Großteil proliferierender Zellen in den Glomeruli in ihrem REMI-Modell Endothelzellen waren. Einen kleinen Teil stellten Mesangialzellen dar, Makrophagen proliferierten nicht (Nangaku et al. 1997). Sollte der Großteil proliferierender Zellen auch in unserem Modell Endothelzellen sein, so spräche dies – im Hinblick auf die von uns beobachtete geringe Anzahl an Transdifferenzierungen von Knochenmarkszellen in Endothelzellen – eher für endogene Reparaturmechanismen residenter Endothelzellen nach Schädigung.

Die Endothelzellen stellten in unserem REMI-Modell die primär geschädigten Zellen dar. Die Gefäßzeichnung, die mittels Reca-1 detektiert wurde, zeigte sich am Tag 21 noch immer rarefiziert. Während Hohenstein et al. diese Rarefizierung mithilfe einer Färbung von Lectin im gesamten Beobachtungszeitraum feststellen konnten (Hohenstein et al. 2007), kam es bei Nangaku et al. nach 10 Tagen zur Normalisierung der Gefäßzeichnung (Nangaku et al. 1997).

Der gelungene Nachweis von EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen, die in die glomeruläre Struktur integriert waren, legte den Schluss nahe, dass es sich hierbei um Stammzellen handeln musste, die sich in Richtung Endothelzellen transdifferenziert hatten (s. Kap. 5.7). Signifikante Unterschiede zwischen UNX und REMI-Tieren ergaben sich für den Tag 10, am Tag 21 war lediglich eine statistisch nicht signifikante Tendenz zu erkennen.

Am Tag 10 gab es bei REMI-Tieren doppelt so viele EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen wie bei UNX-Tieren (0,15 EGFP⁺-Reca-1⁺-Zellen pro Glomerulum vs. 0,07; s. Abb. 16). Am Tag 21 blieb dieses Verhältnis bestehen, jedoch lag die absolute Anzahl an Ko-Lokalisationen niedriger als am Tag 10. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich bei REMI-Tieren stets ein größerer Anteil des glomerulären Nicht-Makrophagen-Anteils an Knochenmarkszellen in Endothelzellen transdifferenziert hatte (Tag 10: REMI 35% vs UNX 20%; Tag 21: REMI 28,5% vs UNX 6%; s. Abb. 20).

Die Rate bei den UNX-Tieren könnte den normalen Endothelzellumsatz widerspiegeln oder als Reaktion auf die Uninephrektomie gewertet werden. Die Hyperfiltration nach Uninephrektomie führt zu einem Endothelzellstress, der mit einem notwendigen Ersatz an Endothelzellen einhergehen könnte. Die doppelt so hohe Anzahl an Ko-Lokalisationen bei den REMI-Tieren ist am ehesten als Reaktion auf den Endothelzelluntergang nach Induktion der REMI-Erkrankung zu sehen. Die niedrigere Zahl an Ko-Lokalisationen am Tag 21 im Vergleich zu Tag 10 (s. Abb. 16) könnte mehrere Gründe haben: Die absolute Anzahl an Endothelzellen pro Glomerulum wurde in dieser Studie nicht erfasst. Es wurde ausschließlich die Anzahl an EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen und die Gesamtzahl EGFP⁺-Zellen pro Glomerulum ermittelt. Die PAS-Färbung zeigte bei REMI-Tieren sklerosierte Glomeruli. Aus diesem Grund könnte eine bei sklerotischen Glomeruli vorliegende geringere absolute Anzahl an Endothelzellen pro Glomerulum die Abnahme an Ko-Lokalisationen erklären. Ob die Anzahl an Ko-Lokalisationen auch relativ zur Anzahl an Endothelzellen abgenommen hat, bleibt letztlich ungeklärt. Jedoch findet sich auch in der Literatur ein ähnlicher Verlauf (Rookmaaker et al. 2003, s. unten).

Ein weiterer Erklärungsversuch findet sich bei Rookmaaker et al.. Sie detektierten Knochenmarkszellen mithilfe eines für Wistarratten spezifischen major histocompatibility complex class-I (MHC-I) und Endothelzellen mithilfe von Reca-1. Die Autoren zeigten, dass sich Knochenmarkszellen in Endothelzellen transdifferenzierten: Sieben Tage nach Injektion von anti-Thy-1.1 kam es bei kranken Tieren zu einer ca. 4-fach höheren Anzahl an knochenmarksentsammenden Endothelzellen (KM-Endothelzellen) im Vergleich zu Kontrolltieren (von ca. 2,5 pro Glomerulum auf ca. 10). Die Zahl an Ko-Lokalisationen war, analog zu unseren Ergebnissen, nach 28 Tagen leicht rückläufig und betrug noch ca. 7 KM-Endothelzellen pro Glomerulum. Diesen Sachverhalt erklärten die Autoren mit einem Beitrag des Knochenmarks zur Resolution eines glomerulären Schadens in der Initialphase mit nachfolgender Umbildung und Apoptose der transdifferenzierten KM-Endothelzellen (Rookmaaker et al. 2003).

Unsere Daten zeigen, verglichen mit Rookmaaker et al. und anderen Autoren (Ikarashi et al. 2005), einen geringeren Unterschied zwischen gesunden und kranken Tieren. Dies könnte daran liegen, dass die Kontrolltiere bei Rookmaaker et al. nicht uninephrektomiert waren. Außerdem ist die Diskrepanz zwischen der hohen absoluten Zahl an in Endothelzellen transdifferenzierten Knochenmarkszellen bei Rookmaaker et al. und der niedrigen absoluten Zahl bei uns augenscheinlich. Ein Grund für diesen Sachverhalt könnte sein, dass in unserem Modell die primär zerstörte Struktur das Endothel ist; beim anti-Thy-1.1-Modell kommt es aufgrund eines anderen Targets, nämlich der Mesangialzelle, sekundär zu einem Endothelzellschaden. Möglicherweise hat dies Auswirkungen auf das Ausmaß des Nierenschadens und Reaktionsmechanismen.

Rookmaaker et al. schließen nicht aus, dass die Ganzkörperbestrahlung zu Dysfunktion residenter Mesangial- und Endothelzellen geführt hat, die einen erhöhten Einbau von Knochenmarkszellen zur Folge hatte (Rookmaaker et al. 2003). Jedoch konnten wir, wie auch Ito et al., trotz Ganzkörperbestrahlung mit ähnlich hohen Dosen (Rookmaaker et al.: 7,2 Gy, Ito et al.: 10 Gy, wir: 9 Gy) keinen relevanten Einbau von Knochenmarkszellen in dem von Rookmaaker et al. beobachteten Ausmaß feststellen, was diese Hypothese eher unwahrscheinlich erscheinen lässt. Zusammenfassend sind Rookmaaker et al. der Ansicht, dass Knochenmarkszellen bei der Instandhaltung und Reparatur von Endothel direkt beteiligt sind - über das Ausmaß dieser Beteiligung wagen sie jedoch keine Aussage (Rookmaaker et al. 2003).

Ito et al. hatten, wie Rookmaaker et al., die Reparatur zerstörter glomerulärer Endothelzellen im anti-Thy-1.1-Modell (ATM-Modell) studiert. Die Detektion von Knochenmarkszellen gelang mithilfe von EGFP, die Detektion von Endothelzellen mithilfe von Recla-1 und Faktor VIII. Einen Ersatz von Endothelzellen durch Knochenmarkszellen konnten sie nicht feststellen. Die Autoren vermuten, dies könne an einer nicht ausreichenden Schwere des Endothelzellschadens liegen, was konsekutiv zu Proliferation von überlebenden Endothelzellen führe, die die glomeruläre Struktur wiederherstellen (Ito et al.

2001). Auch Rookmaaker et al. sehen den Grund für die konvergierenden Ergebnisse zumindest teilweise in einem unterschiedlichen Ausmaß des Endothelzellschadens (Rookmaaker et al. 2003).

Ein Zusammenhang zwischen Schwere des Endothelzellschadens und Endothelzellersatz konnte bereits 1972 in der humanen Transplantationsmedizin hergestellt werden. Transplantierte Gewebe und Organe können mithilfe verschiedener Techniken im Empfängerorganismus nachgewiesen werden. Im einfachsten Falle macht man sich zunutze, dass nach Transplantation von Geweben und Organen in Patienten des anderen Geschlechts, Zellen des Spenders über die Existenz eines beim Empfänger sonst nicht vorhandenen Y-Chromosoms oder Sex-Chromatins detektiert werden können. Sinclair konnte zeigen, dass nach Nieren-Transplantation beim Menschen nur solche Transplantat-Nieren mit Empfänger-Endothel repopuliert wurden, die schwerstgeschädigt waren und eine schlechte Funktion aufwiesen. Transplantate ohne Abstoßungsreaktionen zeigten eine solche Repopulation mit Empfänger-Endothelzellen nicht. Sinclair konnte diese Beobachtungen jedoch nur in peritubulären, nicht in glomerulären Kapillaren machen (Sinclair 1972). Lagaaij et al. zeigten ebenfalls an Transplantat-Nieren, dass das Ausmaß des Endothelzellschadens bei Abstoßungsreaktionen positiv mit dem Ersatz durch wahrscheinlich zirkulierende Progenitorzellen korreliert (Lagaaij et al. 2001). Im Zuge der Ausbildung einer thrombotischen Mikroangiopathie, konnte bei einer weiblichen Patientin, der sechs Monate zuvor männliches Knochenmark transplantiert worden war, die Integration von männlichen Endothelzellen ins Blutgefäßsystem der Niere nachgewiesen werden. Dies war der erste Bericht über eine Transdifferenzierung von Knochenmarkszellen in Endothelzellen der Niere beim Menschen (Rookmaaker et al. 2002). Andersen et al. hingegen konnten in Untersuchungen von Transplantat-Nieren, die eine akute Abstoßungsreaktion zeigten, einen Zusammenhang zwischen Schwere des Endothelzellschadens des Transplantats und Repopulation durch Empfängerzellen nicht finden (Andersen et al. 1991).

Es muss angemerkt werden, dass das ATM-Modell das Modell einer reversiblen Glomerulonephritis darstellt, die selbstlimitierend verläuft und das glomeruläre Endothel nur sekundär schädigt. Etwa acht Wochen nach Induktion der anti-Thy1.1-Glomerulonephritis war bei Ito et al. die normale glomeruläre Struktur wieder hergestellt (Ito et al. 2001). In unserem REMI-Modell, in dem das glomeruläre Endothel das primäre Target darstellt, konnte auch nach acht Wochen nicht von einer Resolution des Nierenschadens gesprochen werden (s. Abb. 3), was suggeriert, dass die REMI-Glomerulonephritis schwerwiegender verläuft als die anti-Thy1.1-Glomerulonephritis. Einen erhöhten Ersatz von Endothelzellen durch Stammzellen konnten wir, verglichen mit Rookmaaker et al., jedoch nicht feststellen, so dass unsere Ergebnisse eine positive Korrelation zwischen Schwere des Endothelzellschadens und Repopulation eher nicht unterstützen können.

Eine weitere Möglichkeit für die gegenteiligen Ergebnisse von Rookmaaker et al. könnte in einer veränderten Expression von EGFP in der EGFP⁺-Endothelzelle sein. In der Literatur lassen sich verschiedene Einflussgrößen auf die Fluoreszenzintensität von GFP finden, wobei die inkorrekte Faltung von GFP einen zentralen Punkt darstellt. Die Temperaturabhängigkeit, die für diese inkorrekte Faltung und damit für die Bildung von nicht-fluoreszierendem GFP hauptsächlich verantwortlich gemacht wurde, bestätigte sich für die Varianten wtGFP und S65T. Das in dieser Arbeit wie auch bei Ito et al. verwendete EGFP zeigt jedoch keine Faltungsfehler bei höheren Temperaturen (Patterson et al. 1997). Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es Parameter gibt, die die Expression von EGFP bei der Transdifferenzierung einer Stammzelle in eine Endothelzelle verändern.

Die niedrige Zahl an Transdifferenzierungen in unserer Studie könnte auch an Schwierigkeiten liegen, die sich bei den Ko-Lokalisationsuntersuchungen von EGFP mit dem membranständigen Endothelzellmarker Reca-1 ergaben. Hier bestand das Problem, die Zugehörigkeit von EGFP⁺-Cytoplasma und Reca-1⁺-

Zellmembran zu ermitteln. Um falsch-positive Ergebnisse durch Zuordnung der Zellmembran zum falschen Zelleib zu vermeiden, wurden strenge Zählkriterien aufgestellt (s. Tabelle 2). Besonders das Fluoreszenzmuster der Reca-1-Färbung bei EGFP-transgenen Tieren, bei denen prinzipiell alle Endothelzellen cytoplasmatisch EGFP exprimierten, diente als Orientierung, um Ko-Lokalisationen mit Reca-1 genauestens zu studieren. Aufgrund der strengen Zählkriterien liegt jedoch eventuell die tatsächliche Anzahl EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen höher als die von uns ermittelte Anzahl.

Zur Detektion von Knochenmarkszellen diente Rookmaaker et al. ein MHC-I-Komplex, der einen membranösen Marker darstellt. Aus diesem Grund fällt die Detektion von Ko-Lokalisationen aufgrund von Fluoreszenzüberlagerungen mit dem ebenfalls membranständigen Marker Reca-1 und konsekutiver Farbänderung leichter. Zu einer solchen Farbänderung kommt es bei Verwendung von EGFP und Reca-1 nicht (s. Abb. 18). Dies könnte zumindest teilweise die Diskrepanz zwischen unseren und den Ergebnissen von Rookmaaker et al. erklären.

Ito et al. hatten, wie wir, EGFP als Tracer verwendet und keine Ko-Lokalisationen von EGFP⁺-Zellen mit Endothelzellen gefunden (Ito et al. 2001). Die Autoren sprechen das gestellte Problem der Zuordnung zwischen Zellmembran und Cytoplasma im ATM-Modell indirekt an. Sie untersuchten Ko-Lokalisationen von Thy1.1, einem Oberflächenantigen auf Ratten-Mesangialzellen, mit EGFP⁺-Zellen. Mithilfe der konfokalen Mikroskopie und morphologischen Zellkriterien entschieden sie, bestimmte Zellen als EGFP⁺-Mesangialzellen zu werten, die detaillierte Beschreibung jedoch zeugt von zumindest vorübergehenden Unsicherheiten bei der definitiven Bestimmung der Zellen (Ito et al. 2001).

Um eine eindeutige Zuordnung bei Fragen nach Ko-Lokalisationen von cytoplasmatischen und membranständigen Markern zu erreichen, könnten z.B. elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Einsatz kommen, mittels derer immunhistologisch EGFP kenntlich gemacht und anhand morphologischer Analyse Endothelzellen nachgewiesen werden können.

Eine Alternative zur Annahme, es sei in unserem REMI-Modell in geringer Zahl zu Transdifferenzierungen von Stammzellen aus dem Knochenmark in Endothelzellen gekommen, stellt die Fusion von Empfänger-Endothelzellen mit Spender-Knochenmarkszellen dar, die zum gleichen histologischen Bild führen würde. Spontane Zellfusion wurde erstmals im Jahre 1961 dokumentiert (Ying et al. 2002). Terada et al. hatten 2002 anhand von in vitro Studien gezeigt, dass Knochenmarkszellen spontan mit anderen Zellen fusionieren können, dass diese Fusion jedoch ein extrem seltenes Ereignis darstellt (~2-11: 1 000 000). In vivo war eine solche Fusion damals noch nicht nachgewiesen worden. Trotzdem warnten die Autoren davor, Zellersatz vorschnell als Ergebnis von Transdifferenzierung zu werten ohne den Genotyp zu kennen, da nur die Kenntnis des Genotyps die Zellfusion endgültig ausschließen könnte (Terada et al. 2002). Ying et al. konnten ähnliche Ergebnisse mit Progenitorzellen des zentralen Nervensystems machen, die mit pluripotenten embryonalen Stammzellen fusionierten und auf diese Weise zu anderen Zelllinien beitragen konnten (Ying et al. 2002). Die Autoren schlugen vor, bei Fragen zu Transdifferenzierung neben Donor-spezifischen Markern auch Rezeptor-spezifische Marker zu verwenden, um auch die Frage einer möglichen Zellfusion beantworten zu können. Dass Zellfusion eine wesentliche Rolle bei Reparaturprozessen spielen könnte, wird jedoch von vielen Autoren eher kritisch gesehen (Li et al. 2006, Rookmaaker et al. 2003, Poulsom et al. 2003, lanus et al. 2003). Einige neuere Studien, die, wie gefordert, Donor- und Rezeptor-spezifische Marker berücksichtigen, betonen jedoch die Rolle von Zellfusionen. So konnten in einer in vivo Studie von Rizvi et al. mindestens 60 % aller durch Knochenmarkszellen ersetzten intestinalen Epithelzellen auf Zellfusion zurückgeführt werden und nicht auf Transdifferenzierung (Rizvi et al. 2006). Aufgrund dieser Ergebnisse können wir nicht ausschließen, dass die von uns gefundenen Ko-Lokalisationen zumindest zum Teil auf Zellfusionen zurückzuführen sind. Trotzdem bleibt die Relevanz beider Phänomene – Zellfusion und Transdifferenzierung – ungewiss (Koestenbauer et al. 2006).

Unsere Untersuchung war darauf ausgelegt, prinzipielle Reaktionsmechanismen von Knochenmarkszellen im Verlauf einer experimentellen anti-Endothelzell-Nephritis zu erforschen und beinhaltet keinen therapeutischen Ansatz. Im Hinblick auf das angestrebte Ziel, Stammzelltherapien in Zukunft als Therapieoption bei entzündlichen Nierenerkrankungen zu etablieren, wird jedoch noch viel Forschungsarbeit zu leisten sein. Vor allem müssen auch die Risiken genauestens erforscht werden. In einer Studie zum Nutzen intrarenaler Injektion von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) bei progressiver Glomerulonephritis im Rattenmodell wurden z.B. nach 60 Tagen in 20 % der Glomeruli Formationen von Adipozyten mit begleitender fibrotischer Reaktion des Gewebes festgestellt (Kunter et al. 2007). Die Autoren legen überzeugend dar, dass diese höchstwahrscheinlich aus den in therapeutischer Absicht verabreichten MSCs entstanden sind. Neben den positiven Eigenschaften von MSCs, wie die wahrscheinlich durch parakrine Effekte bedingte Renoprotektion (Tögel et al. 2005), muss nämlich bedacht werden, dass sich MSCs als multipotente Zellen unter anderem auch in Adipozyten, Chondrozyten oder Osteozyten differenzieren können (Pittenger et al. 1999). Den Grund für die von Kunter et al. beobachtete Maldifferenzierung der MSCs in Adipozyten sehen die Autoren einerseits in der Applikationstechnik der MSCs durch intraglomeruläre Injektion, andererseits in Umgebungsfaktoren, wie Wachstumsfaktoren und Antikörpern, die im Zuge der Glomerulonephritis als auch von den MSCs selbst sezerniert werden.

Zudem sind MSCs große Zellen mit einem Durchmesser von ca. 20 - 30 µm (Tögel et al. 2005) und könnten, sofern sie nicht lokal verabreicht werden, Mikroinfarkte verursachen (Rabelink et al. 2006). Auch eine Karzinogenese von Stammzellen wurde im Mausmodell bereits beschrieben (Houghton et al. 2004). Es wird aus diesen Gründen weitere, intensive Forschung vonnöten sein, um solche Ereignisse zu verhindern und zu verstehen.

Wir konnten anhand des REMI-Modells, als einem Modell mit spezifischer Endothelzellschädigung, den Ersatz von Endothelzellen durch Zellen aus dem Knochenmark nachweisen. Diese könnten bei der Regeneration von glomerulären Endothelzellen von Bedeutung sein, ein relevanter Beitrag des Knochenmarks in Form von Transdifferenzierungen kann bei unseren Ergebnissen, im Einklang mit anderen Studienergebnissen in der Literatur, jedoch nicht unterstützt werden. Ob die dem Knochenmark entstammenden Endothelzellen aber z.B. durch parakrine Effekte zur endogenen Regeneration beitragen können, kann anhand unserer Untersuchung nicht entschieden werden.

Da das Potential einer Stammzelle jedoch entscheidend von ihren Umgebungsfaktoren abhängt, wird unter anderem die intensivere Testung von Wachstumsfaktoren (Poulsom et al. 2003) sowie neue Methoden, die auf eine erhöhte Mobilisierung und biologische Veränderung von Knochenmarkszellen abzielen (Rookmaaker et al. 2003), gefordert. Gleichzeitig wird es nötig sein, ein besseres Verständnis von Differenzierungswegen und -stimuli zu erlangen, um z.B. eine Maldifferentiation (Kunter et al. 2007) zu verhindern.

7 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Promotionsarbeit war es, im REMI-Modell, einer akuten Endothelzellschädigung der Niere, die glomeruläre Infiltration von Knochenmarkszellen und mögliche Transdifferenzierungen dieser Zellen in Endothelzellen zu untersuchen. Transplantiertes EGFP⁺-Knochenmark diente dazu, die Knochenmarkszellen im Verlauf der REMI-Erkrankung verfolgen zu können. Die erfolgreiche Induktion des spezifischen Endothelzellschadens konnte histologisch gesichert werden. Verglichen mit UNX-Tieren wurden bei REMI-Tieren signifikant höhere Zahlen glomerulärer Knochenmarkszellen im Verlauf der Erkrankung beobachtet. Der Hauptteil dieser einwandernden Knochenmarkszellen erwies sich als EGFP⁺-ED-1⁺ und stellte somit Makrophagen dar. EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen konnten – wenn auch nur in einer sehr geringen Anzahl - nachgewiesen werden. In unserem Beobachtungszeitraum von acht Wochen kam es nicht zur Ausheilung des Nierenschadens. Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass eine Infiltration von Knochenmarkszellen in die Niere und eine Transdifferenzierung in Endothelzellen nach Induktion von REMI stattfindet, dass wir jedoch aufgrund der geringen Anzahl an EGFP⁺-Reca-1⁺-Endothelzellen die Bedeutung der Transdifferenzierung als Reparaturmechanismus bei einem Nierenschaden, der sich hauptsächlich an Gefäßendothelien abspielt, als gering einstufen müssen.

II. Literaturverzeichnis

Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* 100(2):174-90

Andersen CB, Ladefoged SD, Larsen S (1991) Cellular inflammatory infiltrates and renal cell turnover in kidney allografts: a study using in situ hybridization and combined in situ hybridization and immunohistochemistry with a Y-chromosome-specific DNA probe and monoclonal antibodies. *APMIS* 99(7):645-52

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290(5497):1775-9

Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, Zhang JJ, Lin S, Liao LM, Zhao RC (2004) Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 117(10):1443-8

Dambeck H (2008) Entdecker von Leuchtprotein gewinnen Nobelpreis. URL: <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,druck-582873,00.html>. Stand: 08.10.2008

Deutsche Stiftung Organtransplantation: Niere. Warteliste und Nierentransplantation. URL: http://www.dso.de/warteliste/niere/main_bottom.html. Stand: 25.08.2008

Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV (2005) Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 115(7):1743-55. Epub 2005 Jun 2

Eurotransplant: Allgemeine Information Nierentransplantation. URL: <http://www.eurotransplant.nl/?id=niere>. Stand: 25.08.2008

Fischbach GD, Fischbach RL (2004) Stem cells: science, policy and ethics. *J Clin Invest* 114(10):1364-70

Golbus SM, Wilson CB (1979) Experimental glomerulonephritis induced by in situ formation of immune complexes in glomerular capillary wall. *Kidney Int* 16(2):148-57

Goldmann, A: Geschichte der Nephrologie. URL: <http://www.dialyse-nk.de/informationen-geschichte.html>. Stand: 10.08.2008

Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, Mi T, Wang H, Pocius J, Hertley CJ, Mejesky MW, Entmann ML, Michael LH, Hirschi KK (2001) Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 938:208-18

Groß, W (2002) Geschichte der Transplantation. URL: <http://www.info-dialyse.de/transhistorie.php>. Stand: 12.08.2008

Haas R, Kronenwett R (2005) Fragen und Antworten zur hämatopoetischen Stammzelle. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln

Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E (2001) Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun* 286(4):779-85

Haller H, de Groot K, Bahlmann F, Elger M, Fliser D (2005) Stem cells and progenitor cells in renal disease. *Kidney Int* 68(5):1932-6

Hamberger L, Hardarson T (2005) Clinical uses of stem cells: which way are we heading? *Sexuality, Reproduction and Menopause* 3(1):23-25

Herold G (ed) (2008) Innere Medizin, S. 588, Köln

Hohenstein B, Braun A, Amann KU, Johnson RJ, Hugo CP (2007) A Murine Model of Site-Specific Renal Microvascular Endothelial Injury and Thrombotic Microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 2007 Nov 28 [Epub ahead of print]

Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, Cai X, Fox JG, Goldenring JR, Wang TC (2004) Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306(5701):1568-71

Ianus A, Holz GG, Theise ND, Hussain MA (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest* 111(6):843-50

Ikarashi K, Li B, Suwa M, Kawamura K, Morioka T, Yao J, Khan F, Uchiyama M, Oite T (2005) Bone marrow cells contribute to regeneration of damaged glomerular endothelial cells. *Kidney Int* 67(5):1925-33

Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Körber T, Schümichen C, Freund M, Nienaber CA (2005) Preservation From Left Ventricular Remodeling by Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Use of Granulocyte-Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI). *Circulation* 112(20):3097-106. Epub 2005 Nov 7

Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M (2001) Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodelling. *J Am Soc Nephrol* 12:2625-2635

Johnson RJ, Alpers CE, Pritzl P, Schulze M, Baker P, Pruchno C, Couser WG (1988) Platelets mediate neutrophil-dependent immune complex nephritis in the rat. *J Clin Invest* 82(4):1225-35

Kang DH, Anderson S, Kim YG, Mazzalli M, Suga S, Jefferson JA, Gordon KL, Oyama TT, Hughes J, Hugo C, Kerjaschki D, Schreiner GF, Johnson RJ (2001) Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis* 37(3):601-11

Koestenbauer S, Zech NH, Dohr G (2006) Trans-Differenzierung von adulten Stammzellen – Ist eine Veränderung in Richtung naiverer Zellen möglich? *J Reproduktionsmed Endokrinol* 3(5):324-30

Krause D, Cantley LG (2005) Bone marrow plasticity revisited: protection or differentiation in the kidney tubule? *J Clin Invest* 115(7):1705-8

Kuhlmann U, Walb D, Luft FC (2003) *Nephrologie*, 4. Auflage. Thieme, Stuttgart

Kunter U, Rong S (2006) Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17(8):2202-12

Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Müller-Newen G, Djuric Z, van Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanceva-Popovska M, Kerjaschki D, Floege J (2007) Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol* 18(6):1754-64. Epub 2007 Apr 25

Lagaaij EL, Cramer-Knijnenburg GF, van Kemenade FJ, van Es LA, Bruijn JA, van Krieken JH (2001) Endothelial cell chimerism after renal transplantation and vascular rejection. *Lancet* 357(9249):33-7

Li B, Morioka T, Uchiyama M, Oite T (2006) Bone marrow cell infusion ameliorates progressive glomerulosclerosis in an experimental rat model. *Kidney Int* 69(2):323-30

Loomans CJ, Wan H, de Crom R, van Haperen R, de Boer HC, Leenen PJ, Drexhage HA, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ, Staal FJ (2006) Angiogenic murine endothelial progenitor cells are derived from a myeloid bone marrow fraction and can be identified by endothelial NO synthase expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(8):1760-7. Epub 2006 May 25

Mathews V, Hanson PT, Ford E, Fujita J, Polonsky KS, Graubert TA (2004) Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. *Diabetes* 53(1):91-8

Nangaku M, Alpers CE, Pippin J, Shankland SJ, Adler S, Kurokawa K, Couser WG, Johnson RJ (1997) A new model of renal microvascular endothelial injury. *J Kidney Int* 52(1):182-94

Nobel Foundation (2008) The Nobel Prize in Chemistry 2008. URL: http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/. Stand: 08.10.2008

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 28;98(18):10344-9. Epub 2001 Aug 14

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2003) Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant Suppl* 3:86-8

Panzer U, Steinmetz OM, Reinking RR, Meyer TN, Fehr S, Schneider A, Zahner G, Wolf G, Helmchen U, Schaerli P, Stahl RA, Thaiss F (2006) Compartment-specific expression and function of the chemokine IP-10/CXCL10 in a model of renal endothelial microvascular injury. *J Am Soc Nephrol* 17(2):454-64. Epub 2005 Dec 28

Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW (1997) Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 73(5):2782-90

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284(5411):143-7

Poulsom R, Alison MR, Cook T, Jeffery R, Ryan E, Forbes SJ, Hunt T, Wyles S, Wright NA (2003) Bone marrow stem cells contribute to healing of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14:S48-S54

Rabelink TJ, van Kooten C (2006) Stem cell therapy for glomerular disease. *J Am Soc Nephrol* 17(8):2086-8

Radounikli A, Stahl RA, Bergmann L, Schoeppe W, Thaiss F (1995) Characterization of the mononuclear cell infiltrate in the glomerulus of rats with glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 10(2):185-90

Reinders ME, Rabelink TJ, Briscoe DM (2006) Angiogenesis and endothelial cell repair in renal disease and allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 17(4):932-42

Remuzzi G, Benigni A, Remuzzi A (2006) Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 116(2):288-96

Rizvi AZ, Swain JR, Davies PS, Bailey AS, Decker AD, Willenbring H, Grompe M, Fleming WH, Wong MH (2006) Bone marrow-derived cells fuse with normal and transformed intestinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(16):6321-5. Epub 2006 Apr 10

Rookmaaker MB, Tolboom H, Goldschmeding R, Zwaginga JJ, Rabelink TJ, Verhaar MC (2002) Bone-marrow-derived cells contribute to endothelial repair after thrombotic microangiopathy. *Blood* 99(3):1095

Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van 't Wout K, Martens AC, Geoldschmeding R, Joles JA, Van Zonneveld AJ, Gröne HJ, Rabelink TJ, Verhaar MC (2003) Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 163(2):553-62

Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romadnani P (2006) Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol* 17(9):2443-56

Segal MS, Baylis C, Johnson RJ (2006) Endothelial health and diversity in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 17(2):323-4

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kathari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP (1998) Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92(2):362-7

Shimomura O (2006) Discovery of Green Fluorescent Protein. In: Chalfie M, Kain SR (ed) Green Fluorescent Protein, Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey

Sinclair RA (1972) Origin of endothelium in human renal allografts. *Br Med J* 4:15-16

Stan RV, Kubitza M, Palade GE (1999) PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23):13203-7

Sumpio BE, Riley JT, Dardik A (2002) Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34(12):1508-12

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545

Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, Krause DS (2000) Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology* 31(1):235-40

Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C (2005) Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1):F31-42. Epub 2005 Feb 15

Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C (2007) Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. *Dtsch Arztebl* 104(23):A1663-70

Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T (2005) Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 16(4):997-1004. Epub 2005 Mar 2

Welsch U (2003) Lehrbuch Histologie, 1. Auflage, Urban und Fischer, München Jena

Wolf G, Ziyadeh FN, Thaiss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA (1997) Angiotensin II stimulates expression of the chemokine RANTES in rat glomerular endothelial cells. Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 100(5):1047-58

Wolf G, Hamann A, Han DC, Helmchen U, Thaiss F, Ziyadeh FN, Stahl RA (1999) Leptin stimulates proliferation and TGF-beta expression in renal glomerular endothelial cells: potential role in glomerulosclerosis. *Kidney Int* 56(3):860-72

Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364(9429):141-8

Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, Haller H, Haubitz M (2003) Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 76(1):1-4

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416:545-548

Zhang J, Hill CE (2005) Differential connexin expression in preglomerular and postglomerular vasculature: accentuation during diabetes. *Kidney Int* 68(3):1171-85

Zohlnhöfer D, Ott I, Mehilli J, Schömig K, Michalk F, Ibrahim T, Meisetschläger G, von Wedel J, Bollwein H, Seyfarth M, Dirschinger J, Schmitt C, Schwaiger M, Kastrati A, Schömig A, REVIVAL-2 Investigators (2006) Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 295(9):1003-10

III. Curriculum vitae

IV. Danksagung

Beginnen möchte ich mit einem herzlichen Dank an meinen Doktorvater, Herrn Prof. Dr. F. Thaiss - zum einen für die Überlassung des spannenden Themas, mehr aber noch für die stets unmittelbare und engagierte Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Mein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Dr. Cathérine Meyer-Schwesinger, die mir mit ihrer gewohnt freundlich-hilfsbereiten Art jederzeit in theoretischen und praktischen Fragen zur Seite stand und mich in meiner Arbeit intensiv unterstützt hat.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dr. R. Stahl für die Möglichkeit danken, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Für die Hilfe bei der histologischen Arbeit möchte ich ganz herzlich Frau Mariola Reczka und Frau Melanie Scharper, für zahlreiche Tipps und große Unterstützung meiner Laborarbeit dem gesamten Laborteam der nephrologischen Abteilung danken.

Nicht unerwähnt bleiben soll mein Dank an Frau Dr. C. Lange (Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation, UKE, Hamburg) für die Durchführung der FACS-Analysen und an Frau M. Omniczynski (Labor für Strahlenbiologie und experimentelle Radioonkologie, UKE, Hamburg) für die Durchführung der Röntgenbestrahlungen.

Ganz besonders am Herzen liegt es mir, mich auf diesem Wege bei meiner Familie und meinen Freunden zu bedanken, die stets eine große Unterstützung waren, mir bei technischen Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mir die Zuversicht vermittelten, die mir manchmal fehlte. Bei meinen Eltern möchte ich mich darüber hinaus für die Ermöglichung meines Medizinstudiums bedanken.

Zum Schluss möchte auch den Zweitprüfern für die freundliche Übernahme der Gutachterfunktion herzlich danken.

V. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
CD	Cluster of differentiation
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EGFP ⁺	EGFP-positiv
EGFP ⁺ -ED-1 ⁻	EGFP-positive Zelle, jedoch kein Makrophage
EGFP ⁺ -ED-1 ⁺	EGFP-positive Makrophagen
EGFP ⁺ -Reca-1 ⁺	EGFP-positive Endothelzellen
EPC	Endothelzell-Progenitorzelle
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
<i>g</i>	gravity (Erdbeschleunigung)
gcs	Glomerular cross section, glomerulärer Schnitt, jeweils 10 µm
GEC	Glomeruläre Endothelzellen
Gy	Gray
HCL	Salzsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IgG	Immunglobulin der Klasse G
KM- Endothelzellen	Endothelzellen aus dem Knochenmark
KMTx	Knochenmarkstransplantation
Min.	Minuten
MSC	Mesenchymale Stammzelle
PBS	Phosphate buffered saline
REMI	Renal endothelial microvascular injury
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts
UNX	Uninephrektomie
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
vWF	Von-Wille-Brandt Faktor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutausstriche	41
Abbildung 2: FACS-Analyse	42
Abbildung 3: Nierenhistologie in der PAS-Färbung	43
Abbildung 4: Darstellung des abgelagerten Kaninchen-IgG	45
Abbildung 5: Serum-Harnstoff und Serum-Kreatinin	46
Abbildung 6: Infiltration von EGFP ⁺ - Zellen fluoreszenzmikroskopisch	47
Abbildung 7: Anzahl infiltrierender EGFP ⁺ -Zellen pro Glomerulum	48
Abbildung 8: Infiltration von EGFP ⁺ - Zellen konfokal.....	49
Abbildung 9: Erfolgreiche Färbung von EGFP	50
Abbildung 10: Darstellung der Doppelfärbung von PCNA und EGFP	51
Abbildung 11: Infiltration ED-1 ⁺ - Zellen, fluoreszenzmikroskopisch.....	52
Abbildung 12: Anzahl infiltrierender EGFP ⁺ - ED-1 ⁺ -Makrophagen pro Glomerulum.....	53
Abbildung 13: Parallele Zählung EGFP ⁺ - Zellen pro Glomerulum	53
Abbildung 14: EGFP ⁺ -ED-1 ⁺ - Makrophagen konfokal	54
Abbildung 15: Prozentualer Anteil EGFP ⁺ - Makrophagen an EGFP ⁺ -Zellen	55
Abbildung 16: Anzahl EGFP ⁺ -Reca-1 ⁺ - Endothelzellen pro Glomerulum	56
Abbildung 17: Parallele Zählung EGFP ⁺ - Zellen pro Glomerulum	57
Abbildung 18: EGFP ⁺ -Reca-1 ⁺ - Endothelzellen konfokal bei EGFP-transgenen Wistarratten	58
Abbildung 19: EGFP ⁺ -Reca-1 ⁺ - Endothelzellen konfokal	58
Abbildung 20: Prozentualer Anteil EGFP ⁺ -Reca-1 ⁺ - Endothelzellen an EGFP ⁺ - ED-1 ⁻ - Zellen	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs	26
Tabelle 2: Zählkriterien am konfokalen Mikroskop	40

Internetseiten

Ein Ausdruck der zitierten Internetseiten findet sich am Ende der Dissertation.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Martina Brinkmeyer

Willkommen in unserer Praxis

[Start](#)

[Informationen](#)

[Die Nieren](#)

[Erkrankungen](#)

[Untersuchungen](#)

[Dialyse](#)

[Formeln](#)

[Ernährung](#)

[Geschichte](#)

[Unser Team](#)

[Praxisrundgang](#)

[Leistungen](#)

[Login \(Ärzte\)](#)

[Anfahrt](#)

[Kontakt](#)

[Impressum](#)

Suche

Boxbergweg 3b
66538 Neunkirchen
Tel.:
06821 / 9 20 88-0

Geschichte der Nephrologie

Seit mehreren Jahrzehnten vor Beginn der Dialyseära " ... wurde das in Europa und wohl auch international traditionell übliche Schema angewandt: Bettruhe und eine Diät, hauptsächlich aus Gemüse, Kohlehydraten und Fett, um den Proteinstoffwechsel zu reduzieren. Diese salzfreie Diät war schal, ohne Gewürze oder irgendeine Art von Geschmacksaufbesserung. Die Patienten litten unter allgemeiner Schwäche, Appetitlosigkeit und Erbrechen. Ernährungsstörungen und zunehmender Eiweißabbau waren die Folge - ein Teufelskreis. Ein Gehalt von nicht protein-gebundenem Stickstoff (NPN) von über 180 mg pro 100 ml Blut wurde, gemäß der Erfahrung, als sicheres Zeichen für einen tödlichen Ausgang gewertet. Die Therapie war im Wesentlichen auf eine oberflächliche Linderung des Leidens beschränkt."

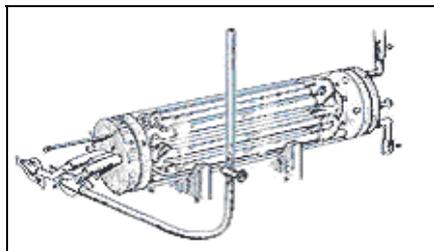
Diese Beschreibung stammt aus den 30-er Jahren. Es stellt weitgehend klar, wie aussichtslos die Lage von Nierenkranken damals war - Hilfe war nicht zu erwarten. Deswegen haben die Ärzte und Wissenschaftler bereits seit Anfang des Jahrhunderts geforscht und experimentiert, um eine "Künstliche Niere" zu konzipieren.

1861

Thomas Graham, der "Vater der Hämodialyse", führte den Begriff "Dialyse" ein. Er berichtete in seiner Arbeit "On Osmotic Force" über die osmotische Kraft. Beschrieben wurde darin die Bewegung verschiedener gelöster Stoffe unterschiedlicher Konzentration durch verschiedene Membranen hindurch.

1913

John J. Abel, Leonhard G. Rowntree und B.B. Turner (Baltimore, USA) entwickelten ein Dialysesystem, mit dem zum ersten Mal das zirkulierende Blut eines Versuchstieres (Kaninchen) dialysiert wurde. Sie nannten dieses Gerät "künstliche Niere". Als Austauschmembran nutzten sie Kollodiumröhren, als Dialysat diente Kochsalzlösung und als Gerinnungshemmer aus Blutegeln extrahiertes Hirudin.



Abels "Künstliche Niere"

1918

W. H. Howell berichtete über eine später als Heparin bezeichnete Substanz. Sie ersetzt seit den 20er Jahren das toxische Hirudin als Gerinnungshemmer und wird noch heute eingesetzt.

1924



John J. Abel

erlebten einen Tiefpunkt der Depression und Hoffnungslosigkeit ... Dabei [bei der Vorführung am Krankenbett] kam es zu einer Verletzung des Zellophandarmes. Der Anblick des Kranken und die Vorstellung, daß das Blut aus seinem Körper durch eine primitive Maschine lief, war schon eine Belastung für den Laien - vielleicht sogar für Ärzte. Als aber darüber hinaus blutig - rötlicher Schaum über die Wanne sprudelte und auf den Fußboden floß, als Bob Noordwijk nach seinen wasserdichten Gummistiefeln griff, da war die Grenze dessen erreicht, was Außenstehende ertragen konnten. In solchen Augenblicken war Kolff so mitgenommen, daß er vergaß, seine Chirurgenmaske abzunehmen und zur Verwunderung der Leute mit der Maske auf dem Gesicht auf dem Fahrrad nach Hause fuhr."

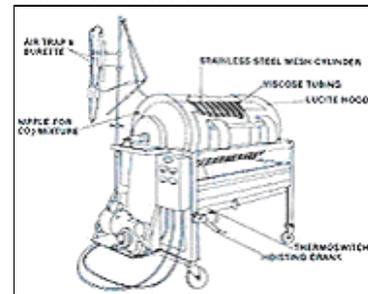
Der Durchbruch gelang erst im September 1945. Nach 16 Dialysebehandlungen einer 68-jährigen Patientin mit akutem Nierenversagen kam es zur Wiederaufnahme der Funktion der eigenen Nieren. Zum ersten Mal in der Geschichte überlebte eine Patientin ein akutes Nierenversagen, das mehrere Wochen dauerte und nur durch die Dialyse nicht zum Tode führte. Effektivität und Machbarkeit der Methode wurden damit bewiesen, weitere Forschung im Bereich der Nierenersatztherapie gesichert.



Dr. Willem Kolff



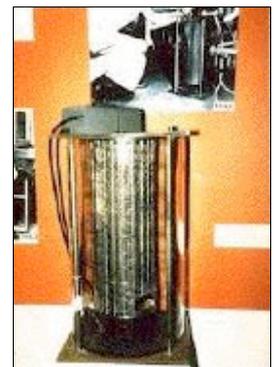
Sophia Schafstadt (1945), Patientin von Dr. Kolff kurz vor der Entlassung aus dem Krankenhaus



Trommelniere

1946

Praktisch parallel zu den Arbeiten von Kolff entwickelte der schwedische Arzt Dr. Nils Alwall ein ähnliches Verfahren, das allerdings etwas bessere Handhabung bot. Er entwickelte eine Art vertikaler Trommelniere - die sogenannte Spuleniire, mit der außerdem der Flüssigkeitsentzug über Ultrafiltration möglich war. Sie bestand aus einem Metallgitter, um das der Zellophanschlauch gewickelt wurde, und aus einer Ummantelung - ebenfalls ein Drahtgitter - die die Ausweitung der Zellophanschläuche während der Dialyse verhinderte. Dadurch wurde der durch die Blutpumpe erzeugte positive Druck auf der Blutseite aufgefangen. Die Erfolge der Therapie waren beachtlich. 1950 gründete Dr. Alwall das erste Dialysezentrum in der Geschichte. Dennoch stieß Dr. Alwall auf erheblichen Widerstand der Kollegen. Leitende Ärzte lehnten die Methode als unethisch ab. Dennoch waren sowohl die Alwall-, als auch die Kolff - Nieren mehr und



Die Spuleniire



Erste Einmalspule nach Kolff-Watschinger

mehr im Einsatz. Besonders in den USA haben die Kolff - Nieren eine größere Verbreitung in den großen Kliniken gefunden. Eine modifizierte s.g. Kolff-Brigham-Niere wurde u. a. im Korea-Krieg für die Soldaten mit einem akuten Nierenversagen eingesetzt, die ohne Dialysebehandlung keine Überlebenschance gehabt hätten. Die Behandlungen dauerten zwischen 6 und 10 Stunden, waren sehr teuer und personalintensiv.

1948

Skeggs und Leonards (Cleveland, USA) entwickelten den ersten Plattendialysator. Eine zwischen zwei Cellophanfolien befindliche geriffelte Gummimembran sorgt hierbei für einen dünnen Blutfilm, das bis dahin notwendige Vorfüllen des Dialysators mit Spenderblut kann nun aufgrund des geringen Auffüllvolumens entfallen.

1950

Erste erfolgreiche Dialyse am Menschen in Deutschland mittels einer von Dr. C. Moeller entwickelten "Künstlichen Niere".



Dr. Kurt Moeller



Dr. Moellers
"Künstliche Niere"

1960

Der norwegische Arzt Dr. Frederik Kiil entwickelte den ersten Plattendialysator, der "nur" ca. 1 m lang war. Außerdem konnte er im Gegensatz zur Trommelniere wiederverwendet werden und eignete sich somit für die damals schon begonnene Behandlung chronisch Kranker. In den 60er Jahren wurde der mehrfach modifizierte norwegische Plattendialysator zum meistverwendeten Dialysator und galt über Jahre als geeignetste "künstliche Niere" für die chronische Dialysebehandlung. Der Einsatz dafür war allerdings ziemlich hoch: Die Kiil-Niere muß nach den 10 bis 16 Stunden dauernden Behandlungen mit hohem Aufwand demontiert, gereinigt, sterilisiert und wieder



Plattendialysator nach Kiil

zusammengebaut werden.

Ebenfalls 1960 entwickelte Belding Scribner in Zusammenarbeit mit Wayne Quinton den nach ihm benannten "Scribner-Shunt". Die Idee war, mit einer implantierten Anschlussvorrichtung aus Teflon und Kunststoff, Nierenkranke auf unbegrenzte Zeit behandeln zu können. Der erste Scribner-Shunt-Patient, Clyde Shields, der am 9. März bewusstlos mit akutem Nierenversagen behandelt wurde, überlebte und konnte viele Jahre lang weiter dialysiert werden. Um der Gefahr einer Verkeimung der Dialyselösung zu begegnen, senkte man die Lösung auf Null Grad ab. Das dadurch abgekühlte Blut wurde im Anschluss wieder erwärmt, indem man es durch ein Warmwasserbad leitete. Im Fall Shields reichte dies nicht aus, was zu starkem Schüttelfrost führte. Nachdem man ihn in eine Heizdecke gewickelt hatte, war das Problem behoben. Weitaus dramatischer war die Keimentwicklung im Dialysat - trotz vorangegangener Kühlung. Nach Erneuerung der Lösung und Sterilisation aller Maschinenteile wurde die Behandlung erfolgreich fortgesetzt, nach 48 Stunden erwachte der Patient, nach insgesamt 76 Stunden wurde die erste Dialyse über einen mehrfach nutzbaren Gefäßzugang beendet. Clyde Shields konnte 1969 nach neun Jahren Klinikdialyse in die Heimdialyse entlassen werden.

1965

James Cimino (New York, USA) entwickelte die erste chirurgische arterio-venöse Fistel. Diese Art des Gefäßanschlusses bedeutete für die Dialysepatienten nicht nur einen länger funktionierenden Gefäßzugang, sondern auch weniger persönliche Einschränkung. Z.B. war jetzt ein Besuch im Schwimmbad möglich, wohingegen es früher schon ein Problem war, zu Hause ein Bad zu nehmen. Dieser aus körpereigenem Gefäßmaterial geschaffene Shunt ist noch heute üblich. Dabei wird in einem chirurgischen Eingriff meist am Handgelenk eine Arterie (Pulsader) mit einer Vene verbunden. Durch den höheren Blutfluss verändert sich die Dicke der Vene, diese kann öfter angestochen werden und kann vor allem die für die Dialyse benötigten großen Blutmengen (200-300 ml Blut / Minute bei modernen Geräten) liefern.

▲ ganz nach oben

info dialyse

- [Startseite](#)
- [Mein Zentrum](#)
- [Transplantationshistorie](#)
- [Dialysehistorie](#)
- [Ersatztherapien](#)
- [Dialysebegriffe](#)
- [Ernährungshinweise](#)
- [Urlaub](#)
- [Erfahrungsberichte](#)
- [Gästebuch/Forum](#)
- [Neuigkeiten](#)
- [Dialyseadressen](#)
- [Organspende](#)
- [Links](#)

Geschichte der Transplantation

Seit jeher übt die Transplantation von Organen und Geweben eine starke Faszination auf die Menschen aus. Aus verschiedenen Kulturkreisen gibt es solche Geschichten die eine Transplantation beschreiben. Der älteste Bericht, eine hinduistische Mythologie, stammt aus dem 12. Jahrhundert vor Christus und beschreibt wie Ganesha der Kopf eines Elefanten transplantiert wurde. Aus dem China des 3. Jahrhunderts vor Christus wird berichtet wie der Arzt Pien Ch'iao Herzen zwischen zwei Menschen austauschte. Die katholischen Schutzpatrone der Pharmazie St. Cosmos und St. Damian sollen im 3. Jahrhundert nach Christus das Bein eines verstorbenen Mooren auf einen weissen Mann transplantiert haben.

Die ersten dokumentierten Transplantationen fanden im 19. Jahrhundert statt, hauptsächlich wurden Hauttransplantationen durchgeführt. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts entwickeln sich, in nur 60 Jahren auf dem Gebiet der Gefäßchirurgie, Antisepsis (Abtötung von Keimen) und Narkoseverfahren, die Voraussetzungen zur Transplantation von Organen in großen Schritten.

1902 Der österreichische Chirurg H. Ullman aus Wien führt die erste Nierentransplantation an einem Hund durch, die als technisch gelungen bezeichnet wird. Er pflanzte die Niere im Nackenbereich des Hundes und führte den Ureter (Harnleiter) durch die Haut nach aussen um die Harnproduktion dokumentieren zu können, die Urinproduktion funktionierte fünf Tage.

1906 Erste Versuche der Nierentransplantation vom Tier auf den Menschen durch Dr. Mathieu Jaboulay, Lyon, leider scheiterten diese Operationen.

1912



Der Franzose Alexis Carrel erhielt 1912 den Nobelpreis 'In Anerkennung seiner Arbeit über die Gefäßnaht und die Transplantation von Blutgefäßen und Organen' -und das heißt: er entwickelte die grundlegenden Techniken dessen, was wir heute Gefäßchirurgie nennen.

Er zeigte unter anderem, daß man Organe transplantieren kann, und wie man abgetrennte Glieder replantiert, gleichzeitig erahnte er damals schon die Probleme von heute wie etwa Abstoßungsreaktionen, Verfügbarkeit und Konservierung von Fremdorganen und vieles mehr.

1930 Karl Landsteiner erhält den Nobelpreis für Medizin und Physiologie für die Entdeckung der Blutgruppen.

1933 Erste Nierentransplantation von einem verstorbenen Spender durch Dr. Yu Yu Voronoy, Kiew. Die Empfängerin überlebt 4 Tage, wobei die Spenderniere zu keinen Zeitpunkt funktionierte.

1944 Der britische Zoologe Sir Brian Medawar war es, der als erster die immunologischen Grundlagen der Abstoßung von fremden Gewebes beschrieb. 1960 erhielt Peter Brian Medawar (1915-1987), Großbritannien "für die Entdeckung der erworbenen immunologischen Toleranz" den Nobelpreis.

1952 Anwendung moderner Medizintechnik: künstliche Beatmung und die externe Herzmassage hat zur Folge, dass Patienten einen Herz- oder Atemstillstand überleben können.

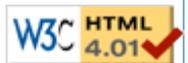
1952 Erste Nierentransplantation durch Professor Hamburger in Paris von einem Lebendspender (Mutter auf Kind), leider nur mit

- vorübergehendem Erfolg.
- 1954** Dr. Joseph Murray, Boston führt die erste als „erfolgreich“ bezeichnete Nierentransplantation am 23.12.1954 durch. Die Organverpflanzung erfolgt zwischen eineiigen Zwillingen also gewebeidentischen Menschen (Isotransplantation).
- 1958** Entdeckung des HLA-Systems (Human Leukocyte Antigen-System) durch Prof. Dausset, Paris - mit seiner Hilfe unterscheidet das Immunsystem anhand spezifischer, ererbter Merkmale zwischen fremdem Gewebe und eigenem. In den folgenden Jahren wurde immer klarer, dass sich durch die Unterdrückung des Immunsystems die Transplantabstossung verhindern lässt.
- 1959** Erste erfolgreiche Verwandtentransplantation in Boston (Merrill) und Paris (Hamburger) zwischen zweieiigen, also genetisch unterschiedlichen Zwillingen. Mit Hilfe von Bestrahlungen gelang es die Abstoßung zu begrenzen. Beide Patienten lebten noch 20, bzw. 26 Jahre
- 1959** Zwei französische Ärzte (Molaret und Goulon) beschreiben erstmals den Zustand des irreversiblen Komas, bei dem das Gehirn durch Sauerstoffmangel irreversibel zerstört wird und bezeichnen diesen Zustand als „Coma dépassé“.
- 1963** Der amerikanische Chirurg Thomas E. Starzl, Denver führte nach über 200 Tierexperimenten die ersten drei Lebertransplantation an Menschen durch. Der erste Patient starb noch während der Operation, der zweite nach siebeneinhalb und der dritte nach 22 Tagen.
- 1964** Erste erfolgreiche Nierentransplantation von Mutter auf Tochter in Deutschland durch Borsig und Nagel in Berlin.
- 1964** Übertragung von Nieren und Herzen von Schimpansen auf Menschen durch Oscar Creech und Keith Reemtsma. Das mehrmonatige Überleben einzelner Patienten liess vermuten, dass auch die Übertragung von Organen zwischen verschiedenen Spezies (Xenotransplantation) bei entsprechender Weiterentwicklung der Immunsuppressiva möglich wäre. Im gleichen Jahr versucht Thomas Starzl Paviannieren auf Menschen in aussichtloser Lage zu übertragen, allerdings misslingen die Operationen.
- 1966** Weltweit erste erfolgreiche Pankreastransplantation durch Dr. R. Lillehei, Minneapolis, die Erfolge hinsichtlich der Organfunktionen waren von Beginn an vielversprechend, aber auch hier musste vor allen an chirurgischen und immunologischen Details gefeilt werden
- 1967** Nach mehreren erfolglosen Versuchen gelingt Dr. Thomas Starzl in Pittsburgh die erste als „erfolgreich“ bezeichnete Lebertransplantation am Menschen.
- 1967** Prof.Christian Barnard führt am 3. Dezember 1967 in Kapstadt (Südafrika) die erste Herztransplantation durch.
- 1967** Gründung von Eurotransplat durch van Rood in Leiden, der in einer Studie nachweisen konnten das die HLA Übereinstimmung bedeutenden Einfluss auf die Überlebenszeit des Transplantierten und die Annahme des neuen Organes hat.
- 1968** Einen Meilenstein in der Geschichte der Transplantationsmedizin stellt im Jahr 1968 der „*Report of the Ad Hoc Committee of Harvard Medical School Examine the of Brain Death*“ dar, in dem die Anerkennung des irreversiblen Komas als neue Definition des Todes befürwortet wird.
- 1970** Durch die Entdeckung von Pilzkulturen (Cyclosporine), in Bodenproben aus der Hardangger-Region, auf der Suche nach neuen Antibiotika, begann eine neue Ära der Transplantationsforschung. Einen Stamm davon schickte man zu Sandoz nach Basel, dem Leiter der Abteilung, Jean-Francois Borel fiel auf, dass diese neue Substanz die Eigenschaft hatte

Lymphozytenkulturen zu hemmen.

- 1976** Man fand heraus, dass die Lymphozytenhemmung etwa 300 Mal stärker war als die gegen andere Zelllinien, diese neuen Erkenntnisse wurden nun publiziert. Nach dieser Veröffentlichung wurden ersten Proben nach Cambridge zu Roy Calne geschickt, um sie im Tierversuch zu testen. Die ersten Ergebnisse waren äusserst erfolgversprechend, das veranlasste Calne zur Empfehlung Cyclosporin A alsbald zur Immununterdrückung bei menschlichen Transplantationen zu testen.
- 1978** Erster klinischer Einsatz von Cyclosporin in England, in Deutschland wurde Cyclosporin erst im Jahr 1983 zugelassen. Ab 1983 war Cyclosporin A fester Bestandteil in der Transplantationsmedizin, die Überlebensraten verbesserten sich radikal. Bereits 1989 konnte man die 100.000ste Nierentransplantation am Menschen feiern.
- 1984** Xenotransplantation eines Pavianherzens auf ein Kleinkind „Baby Fae“ durch Dr. L. Bailey, Kalifornien, USA. Das Kind stirbt 14 Tage später nach einer Abstossung, dadurch wurde eine heftige Diskussion über die Xenotransplantation ausgelöst.
- 1989** Erste Multi-Organ-Transplantation durch Prof. R. Margreiter, Universitätsklinik Innsbruck, Österreich.
- 1990** Erste klinische Erfahrungen (Starzl, USA) mit FK 506 bei Nierentransplantationen, dieses Medikament wird 1995 als Prograf® in Deutschland zugelassen
- 1992** Lebertransplantation vom Pavian (Xenotransplantation) auf den Menschen. Der Empfänger stirbt nach 2 Monaten an einer Hirnblutung (Dr. T. Starzl, USA).
- 1998** Erste Handtransplantation in Lyon (Frankreich) werden in einer 13-stündigen Operation unter Leitung von Prof. Jean-Michel Dubernard erstmals Hand und Vorderarm eines toten Spenders transplantiert.
- 2002** Erste Transplantation einer Gebärmutter wurde in Saudi Arabien vorgenommen. Einer 26-jährigen Frau wurde der Uterus einer 46-Jährigen eingesetzt.

2002 info-dialyse von Werner Groÿ alle Rechte vorbehalten
Sie sind heute der **302** Besucher von bisher insgesamt **1304267**
Besuchern seit Mai 2002.



Niere

[DOWNLOAD](#)[Warteliste und Nierentransplantation](#)

Über 8.000 Dialysepatienten warten in Deutschland auf eine Nierentransplantation. Ihre Zahl ist fast drei mal so hoch wie die der pro Jahr übertragenen Organe.

Im Jahr 2007 wurden 2.907 Patientinnen und Patienten transplantiert.

Die durchschnittliche Wartezeit auf eine Transplantation beträgt etwa fünf Jahre.

- [Warteliste](#)
- [Organvermittlung](#)

Algemeines Information

Nierentransplantation:

Indikation und Erfolgsrate:

Die häufigste Ursache für Nierenerkrankungen im Endstadium ist die diabetische Nephropathie, gefolgt von der Nephroangiosklerose bei Hypertonus und verschiedenen primären und sekundären Glomerulopathien. Alle Patienten mit chronischem Nierenversagen werden für die Nierentransplantation berücksichtigt. Die Überlebensrate der Patienten ein Jahr nach der Transplantation von einem lebenden verwandten Spender beträgt 95% und ist nur unbedeutend geringer, wenn das Organ von einem verstorbenen Spender stammt. Die Funktionsrate nach Transplantation beträgt nach 3-5 Jahren 90-70%. Neu entwickelte Immunsuppressiva und immunologische Kontrollen haben zur Ausdehnung des Empfängeralters von 5 Monaten bis zu 75 Jahren geführt.

Spenderauswahl und Konservierung:

Etwa 1/3 aller Nieren werden von lebenden Verwandten gespendet, die eine intakte beidseitige Nierenfunktion und gute Gewebeverträglichkeit besitzen, aber keine sonstigen allgemeinen Erkrankungen aufweisen. Über 2/3 stammen jedoch von verstorbenen Spendern. Ausgenommen von der Spende sind Menschen mit Gefäßerkrankungen, Diabetes und Krebserkrankungen. Nach Feststellung des Hirntodes sorgt man beim Spender für stabile Kreislaufbedingungen und eine normale Nierenfunktion. Anschließend können die Nieren entfernt, gespült, durch Perfusion gekühlt und in speziellen Eislösungen zur Vorbereitung auf den Transport konserviert werden. Nieren sollten nicht länger als 36 Stunden gelagert werden. Eine Transplantation nach 36 Stunden kann nur dann erfolgreich durchgeführt werden, wenn kontinuierlich eine mit Sauerstoff angereicherte, kalte Plasma-Lösung eingesetzt wird.

Transplantationsverfahren:

Das Transplantationsverfahren ist verhältnismässig einfach und dauert ca. zwei Stunden. Der Patient muss dazu dialysiert und frei von Infektionen sein. Die Niere wird retroperitoneal in die Darmbeingrube transplantiert, mit Gefäßverbindungen zur Arteria und Vena iliaca und der Implantation des Ureters in die Blase.

Komplikationen:

Die Hauptkomplikation ist die Abstoßung des Organs. Bei Nierentransplantationen treten diese meist in den ersten 4 Monaten nach Transplantation auf. Trotz anfänglicher Immunsuppression können die Patienten mehrere akute Abstoßungen erleiden, wobei sich die irreversible chronische Transplantatabstoßung über mehrere Jahre entwickelt. Wenn die Behandlung der Abstoßung erfolglos ist, muss der Empfänger zur Dialyse zurückkehren und auf eine erneute Chance warten. Weitere spätere Komplikationen sind die Nierentoxizität des Cyclosporin A, Infektionen, Nierenerkrankungen und das Auftreten von Tumoren. Das Risiko eines Epithelkarzinoms oder Lymphoms ist 30 mal höher als in der Normalbevölkerung und kann durch Reduzierung oder Unterbrechung der laufenden Immunsuppressionstherapie behandelt werden.



The Nobel Prize in Chemistry 2008

"for the discovery and development of the green fluorescent protein, GFP"

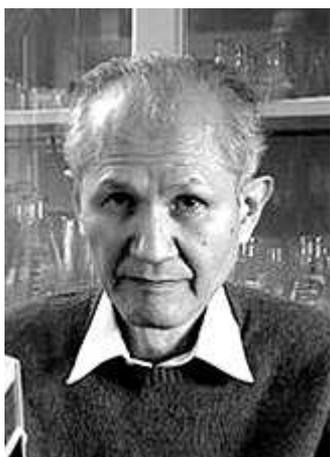


Photo: J. Henriksson/SCANPIX

Osamu Shimomura

 1/3 of the prize

USA

Marine Biological
Laboratory (MBL)
Woods Hole, MA, USA

b. 1928



Photo: J. Henriksson/SCANPIX

Martin Chalfie

 1/3 of the prize

USA

Columbia University
New York, NY, USA

b. 1947



Photo: UCSD

Roger Y. Tsien

 1/3 of the prize

USA

University of California
San Diego, CA, USA

b. 1952

Titles, data and places given above refer to the time of the award.

Entdecker von Leuchtprotein gewinnen Nobelpreis

Zwei US-Forscher und ein Japaner teilen sich den Nobelpreis für Chemie. Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien haben ein grün fluoreszierendes Eiweiß in einer Qualle entdeckt - und damit die Bioforschung entscheidend vorangebracht.

Der Nobelpreis für Chemie geht in diesem Jahr zu gleichen Teilen an den Japaner Osamu Shimomura und die US-Amerikaner Martin Chalfie und Roger Tsien. Sie haben das grünlich leuchtende Protein einer Qualle zu einem der wichtigsten Werkzeuge der Biologie gemacht, wie die Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften am Mittwoch in Stockholm mitteilte. Das leuchtende Protein kann per DNA-Technologie an andere Proteine gekoppelt werden. Auf diese Weise können Forscher die Interaktion und Bewegung der ansonsten unsichtbaren Proteine verfolgen und etwa die Verbreitung von Krebszellen studieren. Die höchste Auszeichnung für Chemiker ist in diesem Jahr mit umgerechnet einer Million Euro (10 Millionen Schwedischen Kronen) dotiert.

1961 isolierte der Japaner Osamu Shimomura erstmals das sogenannte Grün Fluoreszierende Protein (GFP) in einer Qualle namens *Aequorea victoria*. Er hatte festgestellt, dass es unter ultraviolettem Licht leuchtet. Martin Chalfie demonstrierte später, wie hilfreich GFP als Leuchtmarker für verschiedene biologische Phänomene ist. In einem seiner ersten Experimente färbte er sechs Zellen eines durchsichtigen Fadenwurms ein. Roger Tsien Tsien schließlich erweiterte mit seiner Forschung die Farbpalette des Proteins, so dass den zu markierenden Proteinen verschiedene Farben zugewiesen werden können. Alle drei Preisträger lehren und forschen in den USA.

Der frisch gekürte Nobelpreisträger Martin Chalfie erfuhr am Mittwoch erst nach der Weltöffentlichkeit von seiner Auszeichnung. Kurz nach Bekanntgabe durch die schwedische Wissenschaftsakademie meldete der Anrufbeantworter des New Yorker Forschers nur noch "der Speicher ist voll!". "Martin Chalfie haben wir telefonisch leider nicht erreicht", berichtete Akademiesekretär Gunnar Öquist in Stockholm. "Wir haben ihm eine E-Mail geschickt, dass er den Nobelpreis bekommen hat."

Information kam per E-Mail

Mit ihrer Entdeckung haben die drei Forscher die Laborforschung revolutioniert: Mit dem Protein GFP ließen sich biologische Prozesse beobachten, die zuvor unsichtbar gewesen seien, wie etwa die Entwicklung von Nervenzellen im Gehirn, begründete das Nobelpreiskomitee seine Entscheidung. Indem Mediziner und Biologen die DNA des Leuchtproteins mit der DNA eines anderen, ansonsten unsichtbaren Proteins verknüpfen, können sie unter dem Mikroskop die Bewegungen, Positionen und das Zusammenspiel der Proteine und Zellen in lebenden Organismen beobachten.

Mit dem Markerprotein lässt sich beispielsweise die Entwicklung der Insulin produzierenden Beta-Zellen in der Bauchspeicheldrüse von Embryonen beobachten. Für die Entwicklung der modernen Biowissenschaften sei diese Technik "zwingend erforderlich" gewesen, erklärte das Nobelkomitee.

Am Montag und Dienstag hatten das Karolinska-Institut und die Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften bereits die Preisträger in den Bereichen Medizin und Physik bekanntgegeben. Der Medizin-Nobelpreis 2008 geht **an den deutschen Krebsforscher Harald zur Hausen** sowie die beiden französischen Entdecker des Aids-Virus, Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi. Zur Hausen hatte herausgefunden, **dass Viren Gebärmutterhalskrebs auslösen können, was zur Entwicklung eines Impfstoffs geführt hat.**

Der Nobelpreis für Physik wird in diesem Jahr **an drei Wissenschaftler aus Japan und den USA** für ihre Grundlagenforschung über die kleinsten Bausteine der Materie vergeben. Eine Hälfte des Preises geht an den aus Japan stammenden US-Wissenschaftler Yoichiro Nambu für die **Entdeckung der sogenannten Spontanen Symmetriebrechung**. Die andere Hälfte des Preises teilen sich die beiden Japaner Makoto Kobayashi und Toshihide Maskawa, die die Existenz einer dritte Quarkfamilie postuliert hatten. Die Welt verdanke dem Trio ein tieferes Verständnis der Teilchenphysik, erklärte die Königlich Schwedische Akademie der Wissenschaften am Dienstag in Stockholm.