

# **Ektope Nestinexpression nach experimenteller Nierentransplantation**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von  
**Michael Skwirba**  
aus  
Mannheim

**Gießen 2013**

**AUS DER KLINIK FÜR ALLGEMEIN-, VISZERAL-, THORAX-, TRANSPLANTATIONS- UND  
KINDERCHIRURGIE DER UNIVERSITÄTSKLINIKUM GIEßEN UND MARBURG GMBH,  
STANDORT GIEßEN**

**SEKTION EXPERIMENTELLE CHIRURGIE  
LEITUNG: FRAU PROF. DR. RER. NAT. VERONIKA GRAU**

**Gutachter:** Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau

**Gutachter:** Herr Prof. Dr. med. Thomas Linn

**Tag der Disputation:** 23.09.2013

## Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort

Datum

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>06 – 21</b>
1.1	Nierentransplantationen .....	06 – 07
1.2	Tiermodell .....	07
1.3	<b>Pathogenese der chronischen Transplantatabstoßung .....</b>	<b>07 – 16</b>
1.3.1	Alloantigenunabhängige Faktoren .....	07 – 08
1.3.2	Alloantigenabhängige Faktoren .....	08 – 16
1.3.2.1	Akute Abstoßungsepisoden .....	08 – 11
1.3.2.2	MHC-Antigene .....	11
1.3.2.3	Direkte vs. indirekte Antigenpräsentation .....	11 – 13
1.3.2.4	Antikörper .....	13 – 14
1.3.2.5	Zytokine, Wachstumsfaktoren und chronische Transplantatvaskulopathie .....	14 – 16
1.4	<b>Nestin .....</b>	<b>16 – 20</b>
1.4.1	Proteineigenschaften .....	16 – 17
1.4.2	Nestinexpression im embryonalen und adulten Gewebe .....	17 – 18
1.4.3	Renale Nestinexpression .....	18 – 20
1.5	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>22 – 39</b>
2.1	<b>Material .....</b>	<b>22 – 28</b>
2.1.1	Reagenzien .....	22 – 24
2.1.2	Geräte und Materialien .....	24
2.1.3	Lösungen .....	25 – 28
2.2	<b>Methoden .....</b>	<b>29 – 39</b>
2.2.1	Transplantation .....	29
2.2.1.1	Versuchstiere .....	29
2.2.1.2	Transplantation von Rattennieren .....	29
2.2.1.3	Einfrieren .....	29
2.2.2	Immunhistologie .....	30 – 33
2.2.2.1	Silanisierung der Objektträger .....	30
2.2.2.2	Anfertigung der Gewebeschnitte .....	30
2.2.2.3	Einzelfärbungen .....	30 – 31
2.2.2.4	Gegenfärbung .....	32
2.2.2.5	Entwässern und Eindecken .....	32
2.2.2.6	Doppelfärbungen .....	32 – 33
2.2.3	Nachweis von nestincodierender mRNA in experimentellen Nierentransplantaten .....	34 – 36
2.2.3.1	RNA-Isolierung .....	34
2.2.3.2	Synthese von komplementärer DNA (cDNA) .....	34
2.2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	35 – 36
2.2.3.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	36
2.2.3.5	Sequenzierung der PCR-Produkte .....	36
2.2.4	SDS-Gelelektrophorese und Westernblot .....	37 – 39
2.2.4.1	Probenaufbereitung .....	37
2.2.4.2	Bestimmung des Proteingehaltes .....	37
2.2.4.3	SDS-Gelelektrophorese .....	37 – 38
2.2.4.4	Blotting .....	39

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40 – 49</b>
<b>3.1</b>	<b>Immunhistologie.....</b>	<b>40 – 46</b>
3.1.1	Einzelfärbungen .....	40 – 42
3.1.1.1	Unbehandelte Nieren .....	40
3.1.1.2	Isogene Transplantate .....	40 – 41
3.1.1.3	Allogene Transplantate .....	42
3.1.2	Doppelfärbungen.....	43 – 46
<b>3.2</b>	<b>Nachweis nestincodierender mRNA mittels quantitativer real-time RT-PCR.....</b>	<b>46 – 47</b>
<b>3.3</b>	<b>Westernblot .....</b>	<b>48 – 49</b>
3.3.1	Unbehandelte Nieren.....	48
3.3.2	Isogene Transplantate.....	48
3.3.3	Allogene Transplantate.....	49
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50 – 59</b>
<b>4.1</b>	<b>Vor- und Nachteile des Tiermodells.....</b>	<b>50 – 51</b>
<b>4.2</b>	<b>Nestinexpression in untransplantierten Kontrollnieren .....</b>	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Nestinexpression nach isogener Nierentransplantation .....</b>	<b>51 – 52</b>
<b>4.4</b>	<b>Nestinexpression nach allogener Nierentransplantation .....</b>	<b>52 – 55</b>
4.4.1	Akute Abstoßungsepisode: 9. postoperativer Tag.....	52 – 54
4.4.2	Phase des chronischen Gefäßumbaus: 42. postoperativer Tag ..	54 – 55
<b>4.5</b>	<b>Herkunft und Funktion nestinpositiver Zellen.....</b>	<b>55 – 59</b>
4.5.1	Nestinimmunreaktive interstitielle Zellen .....	55 – 56
4.5.2	Nestinimmunreaktive Zellen der arteriellen Intima.....	57 – 58
4.5.3	Nestinimmunreaktive Zellen in der Nähe von Monozyten/Makrophagen.....	58 – 59
<b>4.6</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>59</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>60 – 61</b>
<b>5.1</b>	<b>Ektope Nestinexpression nach experimenteller Nierentransplantation. ....</b>	<b>60</b>
<b>5.2</b>	<b>Ectopic nestin expression after experimental kidney transplantation. ....</b>	<b>61</b>
<b>6.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>62 – 64</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>65</b>
7.1	Abbildungen .....	65
7.2	Tabellen.....	65
<b>8.</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>66 – 76</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>77</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>78</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Nierentransplantationen

Neben der Häm- und Peritonealdialyse ist die Nierentransplantation derzeit die einzige Therapieoption der terminalen Niereninsuffizienz. Hierbei ist die Transplantation den Organersatzverfahren insbesondere bezüglich der Lebenserwartung und der Lebensqualität des Patienten überlegen und daher in den meisten Fällen die angestrebte Therapieoption. Laut Eurotransplant wurden im Jahr 2010 in Deutschland 2937 Nierentransplantationen durchgeführt. Davon stammten 2272 von verstorbenen [31] und 665 von lebenden Spendern [32]. In Abhängigkeit von zahlreichen individuellen Faktoren der Spender und Empfänger, lebendem oder verstorbenem Organspender und der transplantierenden Klinik, sind trotz immunsuppressiver Therapie nach 5 Jahren nur noch zwischen 55% und 80% der Transplantate funktionsfähig [20]. Immunologische Abstoßungsreaktionen stellen die häufigste Ursache für den Verlust eines transplantierten Organes dar. Es kann prinzipiell zwischen hyperakuter, akuter und chronischer Abstoßung unterschieden werden. Während die, durch präformierte Antikörper verursachte [4] hyperakute Abstoßung durch die Entwicklung präoperativer Testverfahren [63, 90] zu einer klinisch seltenen Komplikation geworden ist und akute Abstoßungen durch den Einsatz moderner Immunsuppressiva hocheffektiv behandelbar geworden sind, ist die chronische Allotransplantatnephropathie (CAN) zum wichtigsten limitierenden Faktor des Langzeitüberlebens humaner Nierentransplante geworden und schätzungsweise für mehr als 80% aller Transplantatverluste innerhalb der ersten 10 Jahre nach Transplantation verantwortlich [60, 106]. Sie beginnt Monate bis Jahre post transplantationem und stellt einen langsam progredienten und derzeit therapeutisch nicht beherrschbaren Prozess dar, der sowohl alloantigenabhängig als auch -unabhängig vermittelt wird [60] und im Funktionsverlust des Transplantates resultiert. Die CAN ist als histopathologisches Syndrom definiert, welches die chronische Transplantatvaskulopathie (*chronic allograft vasculopathy*, CAV), Glomerulopathie, Tubulusatrophie und interstitielle Fibrose umfasst [35, 60]. Wesentliches Charakteristikum der CAV ist die arterielle Media- und Intimahyperplasie mit Lumenobliteration und daraus resultierender Minderperfusion des Transplantates. Die Pathogenese der CAN ist bisher kaum verstanden und es existiert keine wirksame Therapie. Von besonderer Bedeutung ist, dass akute Abstoßungsepisoden als wesentlicher Trigger für die Entwicklung einer CAN gelten [3].

Beim Menschen ist es nahezu unmöglich die antigenabhängigen und -unabhängigen Faktoren der CAN voneinander zu trennen. Tierexperimentelle Ansätze ermöglichen die fokussierte Untersuchung der alloantigenvermittelten Pathogenese.

## 1.2 Tiermodell

Um die Pathogenese der chronischen Abstoßung untersuchen zu können, wurden für diese Arbeit allogene und als Kontrolle dienende isogene Nierentransplantationen in Ratten durchgeführt. Hierfür wurden die beiden Inzuchtstämme Fischer 344 (F344) und Lewis verwendet. Für allogene Transplantationen dienten männliche Tiere vom Stamm F344 als Spender und männliche Tiere vom Stamm Lewis als Empfänger. Um zwischen immunologischen und operativ bedingten Organschädigungen unterscheiden zu können, wurden isogene Transplantationen mit ebenfalls männlichen Tieren innerhalb des Stammes Lewis durchgeführt. Das hier verwendete Modell der chronischen Abstoßung F344→Lewis ist durch einen partiellen *mismatch* im *major histocompatibility complex-I* (MHC-I) charakterisiert und ähnelt in seinem histopathologischen Verlauf stark der chronischen Abstoßung humaner Nierentransplantate [77]. Es wurde bereits 1969 von White et al. [135] entwickelt und gilt als etabliertes und am besten untersuchtes experimentelles Modell der chronischen Abstoßung. In transplantierten Nieren kommt es bis zum 9. postoperativen Tag zu einer reversiblen und selbstlimitierenden akuten Abstoßungsepisode [135]. Nach 3 Monaten kommt es zur Entwicklung einer Proteinurie [135], nach 6 Monaten kann das Vollbild der CAV beobachtet werden, auch wenn die als wesentlicher Trigger geltende frühe akute Abstoßungsepisode durch suboptimale pharmakologische Therapie mit Ciclosporin behandelt wurde [77]. Empfänger können ohne Therapie mindestens 48 Wochen überleben [135]. In der vorliegenden Arbeit wurden allogene Transplantate sowohl während der akuten Abstoßungsepisode am 9. postoperativen Tag, als auch 42 Tage nach Transplantation während der Phase des chronischen Gefäßumbaus untersucht. Auf eine immunsuppressive Behandlung der Tiere wurde verzichtet.

## 1.3 Pathogenese der chronischen Transplantatabstoßung

### 1.3.1 Alloantigenunabhängige Faktoren

Antigenunabhängige Prozesse können zu Transplantatschäden führen, die den immunologisch bedingten Schädigungen stark ähneln. Nicht-immunologische Faktoren werden kontrovers diskutiert und bieten eine mögliche Erklärung für den Transplantatverlust von Patienten mit postoperativ abstoßungsfreiem Verlauf. Insbesondere prolongierte Ischämiezeiten [56, 72, 125, 129] und postoperative Infektionen [56, 125] gelten als Risikofaktoren einer CAN. Auch eine Hyperlipidämie

des Empfängers und eine Hyperfiltration aufgrund inadäquater Organmasse werden als CAN auslösende Faktoren diskutiert [18, 56, 125]. Durch experimentelle Nierentransplantationen an Ratten konnte gezeigt werden, dass Transplantate hirntoter Spender signifikant häufiger zu Grunde gehen, als Transplantate von Lebendspendern [95]. Eine der frühesten Folgen des Hirntodes ist die Endothelaktivierung im Sinne einer verstärkten Expression endothelialer Adhärenzmoleküle der Selektinfamilie, welche die leukozytäre Diapedese fördern [36]. Die in das Gewebe infiltrierten Leukozyten werden durch lokal freigesetzte Zytokine aktiviert und setzen inflammatorische Kaskaden in Gang, die das Organ schädigen. In den peripheren Organen hirntoter Ratten kommt es innerhalb der ersten 6 Stunden nach dem induzierten Hirntod zu kontinuierlich ansteigenden Konzentrationen der Interleukine (IL) IL-1, IL-2, IL-6, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), sowie in der Folge zu einer signifikant erhöhten Expression der Oberflächenantigene MHC-I und MHC-II, was eine intensivere Reaktion des Empfänger-Immunsystems auf das transplantierte Organ ermöglicht [118, 129]. Somit bewirken alloantigenunabhängige Faktoren der CAN eine Aktivierung inflammatorischer Zellen und eine verstärkte Expression von Oberflächenmolekülen, die zur antigenabhängigen Aktivierung des Immunsystems führen. Daher können alloantigenunabhängige Faktoren als wesentliche Auslöser der CAN betrachtet werden [60].

### **1.3.2 Alloantigenabhängige Faktoren**

#### **1.3.2.1 Akute Abstoßungsepisoden**

Akute Abstoßungsepisoden sind der wichtigste Risikofaktor für die Entwicklung einer CAN [3, 58]. In klinischen Studien zeigen nierentransplantierte Patienten, die nie eine akute Abstoßung erfahren haben, eine durchschnittliche 5-Jahresüberlebensrate von 92% verglichen mit 45% für Patienten, die mindestens eine akute Abstoßung durchgemacht haben [124]. Entsprechend können akute Abstoßungsepisoden als prognostischer Faktor bezüglich des Langzeitüberlebens von Transplantaten betrachtet werden. Dennoch entwickeln nicht alle Patienten, die eine akute Abstoßung erfahren haben, auch eine CAN. Vielmehr scheint dies von der Schwere, der Anzahl und dem Zeitpunkt akuter Abstoßungsepisoden beeinflusst zu werden [58]. So zeigen Patienten mit wiederholten akuten Abstoßungsepisoden signifikant schlechtere Langzeitüberlebensraten als Patienten, die lediglich eine oder keine akute Abstoßung erfahren haben [109]. Akute Abstoßungen innerhalb der ersten 3 Monate post transplantationem haben womöglich keinen Einfluss auf die Entwicklung einer CAN, während akute Abstoßungen nach mindestens 4 Monaten post transplantationem signifikant mit der Entwicklung einer CAN assoziiert sind [58, 109].

Tullius et al. [124] führten allogene Nierentransplantationen an Ratten durch und retransplantierten akut abgestoßene Nieren nach 3, 4, 5 und 7 Tagen zurück in einen isogenen Empfänger. Hierbei erholten sich Transplantate, die nach 3 Tagen retransplantiert wurden, vollständig. 5 von 12 Transplantaten, die nach 4 Tagen retransplantiert wurden, gingen zu Grunde. Alle Empfänger, die eine Niere nach 5 oder 7 Tagen retransplantiert bekamen, verstarben kurz darauf an terminalem Nierenversagen. Womöglich ist die stärkere immunologische Schädigung des Transplantates für die Irreversibilität fortgeschrittener Abstoßungen verantwortlich. Auf längere Sicht ist auch ein dominierender Einfluss alloantigenunabhängiger Faktoren denkbar. Durch den Verlust funktionsfähiger Nephrone kommt es womöglich zu einer Überbeanspruchung der verbliebenen Nephrone, was zum fibrotischen Transplantatumbau führen könnte [18, 124]. Unabhängig von klinisch relevanten akuten Abstoßungen können Patienten auch klinisch unauffällige subakute Abstoßungen erfahren, die womöglich durch konstante immunologische Transplantatschädigung im Bild der CAN münden [109].

In dem für diese Arbeit verwendeten Tiermodell der chronischen Abstoßung erfahren Transplantatempfänger eine spontan selbstlimitierende akute Abstoßungsepisode, die ihren Höhepunkt um den 9. postoperativen Tag erreicht [51, 140]. Der Vorgang der spontanen Selbstlimitierung ist kaum verstanden. Leukozyten, insbesondere monozytäre Phagozyten, scheinen eine entscheidende Rolle für die akute Abstoßungsepisode nach F344→Lewis Transplantation zu spielen. Bis zum 9. postoperativen Tag akkumulieren ca. 150 Millionen Leukozyten in allen Abschnitten des vaskulären Systems [51], von denen einige mit der Gefäßwand interagieren. Diese Leukozytenpopulation besteht zu etwa 70% aus Monozyten, zu 19% aus T-Zellen, zu 5% aus natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), zu 4% aus B-Zellen und zu 2% aus Granulozyten [51]. Die Anzahl der Leukozyten in den Blutgefäßen des Transplantats nimmt tendenziell nach dem 9. postoperativen Tag ab und erreicht bis zum 16. postoperativen Tag ein Plateau von ca. 50 Millionen Zellen [140]. Monozyten, gefolgt von T-Zellen stellen zu jedem Zeitpunkt der akuten Abstoßungsepisode die Mehrheit der Leukozytenpopulation dar [140]. Zakrzewicz et al. [140] untersuchten Leukozyten während der akuten Abstoßungsepisode auf ihre Zytokin- und Oberflächenmolekülexpression hin. Sie konnten zeigen, dass sich monozytäre Zellen, die während der selbstlimitierenden akuten Abstoßungsepisode im Gefäßsystem des allogenen Transplantates akkumulieren, in einem ungewöhnlichen Zustand partieller Aktivierung befinden. So ist zwar der Anteil von Monozyten, die positiv für die beiden Oberflächenantigene und typischen Aktivierungsmarker MHC-II und *cluster of differentiation 161* (CD161) sind, im allogenen Transplantat signifikant erhöht, jedoch

bleibt die klassischerweise für aktivierte mononukleäre Zellen typische Expression der Interleukine IL-6 und IL-12 unverändert. Des Weiteren konnte kein signifikanter Anstieg der Zytokine IL-4 und *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) festgestellt werden. Es kommt hingegen zu einer gesteigerten Expression des antiinflammatorisch wirkenden IL-10. Womöglich spielt die ungewöhnliche Zytokinexpression mononukleärer Zellen während der akuten Abstoßungsepisode eine Rolle in der spontanen Selbstlimitierung. Des Weiteren konnten Zakrzewicz et al. [140] eine signifikant erhöhte *messenger ribonucleic acid* (mRNA)-Expression von IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und TNF- $\alpha$  in intravasalen Monozyten nachweisen. Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führen zur Endothelaktivierung und der verstärkten Expression von Adhärenzmolekülen wie *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und E-Selectin [21, 45, 131, 133, 134], welche die Transmigration von Empfängerleukozyten in das Transplantatgewebe ermöglichen [45]. Die iNOS wird typischerweise von aktivierten Monozyten/Makrophagen exprimiert und führt lokal zu hohen NO-Konzentrationen, die zytotoxisch wirken können [38]. Die gesteigerte iNOS- und TNF- $\alpha$ -Expression intravasaler Monozyten ist potentiell in der Lage das Endothel des Transplantates zu schädigen. Holler et al. [51] konnten außerdem zeigen, dass Leukozyten und Monozyten im Gefäßsystem gesunder und isogen transplantierte Nieren in der Lage sind, Neuropeptid Y (NPY)-mRNA und NPY zu exprimieren und dass diese Expression sowohl während einer fatalen akuten Abstoßung als auch während einer selbstlimitierenden akuten Abstoßungsepisode drastisch auf 1% des Kontrollniveaus herunterreguliert wird. Neben zahlreichen anderen Funktionen ist NPY in der Lage die Transmigration von Leukozyten sowie deren Adhäsion an endotheliale Strukturen zu regulieren [85].

Wilczynska et al. [137] untersuchten intravaskuläre Leukozyten auf ihre Acetylcholin synthese (ACh-Synthase) hin. Endothelzellen und glatte Muskelzellen der Gefäße exprimieren sowohl muskarinerge (mAChR) als auch nicotinerge (nAChR) ACh-Rezeptoren. Während die Stimulation endothelialer mAChR über NO-Freisetzung zur Vasodilatation führt [53], scheint die Stimulation von nAChR u.a. über eine Induktion des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) zur Endothelproliferation zu führen [24, 49]. Wilczynska et al. [137] untersuchten intravaskuläre Leukozyten am 9. und 42. postoperativen Tag sowohl nach allogener, als auch nach isogener Nierentransplantation. Sie konnten zeigen, dass die Expression zweier wesentlicher Enzyme der ACh-Synthesemaschinerie, Cholinacetyltransferase (ChAT) und *high affinity choline transporter-1* (CHT1), in intravaskulären Leukozyten allogener Nierentransplantate signifikant erhöht war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass

mit dem Cholinesteraseinhibitor (ChE-Inhibitor) Rivastigmin behandelte Transplantatempfänger eine deutlich massivere CAV entwickelten als eine Placebogruppe. ChE spalten Acetylcholin und deaktivieren es somit. Die Blockade der ChE führt folglich zu erhöhten ACh-Konzentrationen.

Die hier zitierten Arbeiten haben wesentliche Beiträge zum besseren Verständnis der akuten Abstoßungsepisode nach F344→Lewis Nierentransplantation geleistet. Insgesamt handelt es sich jedoch um ein schlecht verstandenes Ereignis, das weiterer Untersuchung bedarf.

### 1.3.2.2 MHC-Antigene

MHC-Antigene, die durch das Immunsystem des Transplantatempfängers als körperfremd erkannt werden, stellen post transplantationem die wesentliche Zielstruktur des Empfängerimmunsystems dar und sind deshalb für die Pathogenese der chronischen Abstoßung von entscheidender Bedeutung. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten an ihrer Oberfläche exprimiert. Antigenpräsentierende Zellen (APC) wie bspw. B-Zellen, Makrophagen und aktivierte Endothelzellen exprimieren zusätzlich MHC-II-Moleküle, über die Fragmente prozessierter Antigene präsentiert werden können [116]. Insbesondere antigenunabhängige Faktoren können zu einer verstärkten Expression von MHC-Antigenen und somit zu einer erhöhten Immunogenität des Transplantates führen [118, 129]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate von Transplantaten wesentlich durch die Übereinstimmung von Spender und Empfänger MHC-Antigenen beeinflusst wird. So sinkt die Langzeitüberlebensrate des Transplantates mit jedem MHC-*mismatch* um ca. 5% [130] und 50% der MHC-kompatiblen Transplantate überleben durchschnittlich 12,4 Jahre, verglichen mit 8,6 Jahren bei MHC-Inkompatibilität [121]. Die Übereinstimmung von Spender und Empfänger MHC-Antigenen ist mit einer signifikant erhöhten Langzeitüberlebensrate assoziiert [110, 121].

### 1.3.2.3 Direkte vs. indirekte Antigenpräsentation

T-Zellen können körperfremde MHC-Antigene auf direktem oder indirektem Wege erkennen. Hierbei sind CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowohl für die akute als auch für die chronische Abstoßung elementar [67]. Die Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erfolgt durch APCs. Während des direkten Weges werden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen des Empfängers MHC-II-Antigene des Spenders als intakte zelleigene Moleküle auf der Oberfläche von Spender-APCs präsentiert, was zur bevorzugten Differenzierung in CD4<sup>+</sup>-Typ1-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>1-Zellen) zu führen scheint [108] und u.a. in der anschließenden

Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen resultiert [58, 60]. Während des indirekten Weges werden den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen des Empfängers hingegen Fragmente von prozessierten Spender-MHC-Antigenen durch MHC-II-Antigene auf körpereigenen APCs des Empfängers präsentiert, was zur bevorzugten Differenzierung in CD4<sup>+</sup>-Typ2-T-Helferzellen (T<sub>H</sub>2-Zellen) zu führen scheint [108]. Mehrere Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Aktivierung von T<sub>H</sub>1-Zellen durch Alloantigene zur akuten Abstoßung führt [17, 73, 108], während die Aktivierung von T<sub>H</sub>2-Zellen zur CAN beiträgt [8, 16, 104, 108, 128, 138]. So erfahren experimentelle allogene Transplantate, in denen die für den direkten Weg notwendigen Spender-APCs präoperativ entfernt oder ausgeschaltet wurden, keine akute, jedoch eine chronische Abstoßung [8, 73, 108]. Baker et al. konnten in klinischen Studien zeigen, dass Patienten mit CAN signifikant mehr indirekt aktivierte T<sub>H</sub>2-Zellen aufweisen als Patienten einer Kontrollgruppe mit intakter Transplantatfunktion [6]. Des Weiteren lassen sich in Organtransplantaten, die eine chronische Abstoßung erfahren, hauptsächlich T<sub>H</sub>2-Zytokine nachweisen [60]. Ebenso sind die typischen T<sub>H</sub>1-Zytokine IL-2 und IFN-γ nachweisbar [41, 48], so dass trotz zahlreicher experimenteller und klinischer Belege für eine dominierende Rolle der T<sub>H</sub>2-Immunantwort in der Pathogenese der CAN auch die T<sub>H</sub>1-Immunantwort von Bedeutung sein könnte.

Die klinisch am häufigsten eingesetzten Immunsuppressiva, inklusive der weitverbreiteten Calcineurininhibitoren, blockieren zwar effektiv die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen in T<sub>H</sub>1-Zellen, die Differenzierung in T<sub>H</sub>2-Zellen wird davon jedoch weniger beeinflusst [103] und scheint durch die Blockade der T<sub>H</sub>1-Immunantwort sogar bevorzugt zu werden [25, 42, 60, 65, 103, 108]. Dies bietet eine mögliche Erklärung für die hocheffektive Wirkung moderner Immunsuppressiva auf die akute Abstoßung, während chronische Abstoßungen nach wie vor pharmakologisch kaum beherrschbar sind. Die beiden Typen von T-Helferzellen unterscheiden sich wesentlich in ihrer biologischen Funktion und Zytokinproduktion. T<sub>H</sub>1-Zellen leiten insbesondere die zelluläre Immunantwort ein und produzieren IL-2, IFN-γ und TNF-α, während T<sub>H</sub>2-Zellen insbesondere die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 und TGF-β exprimieren und wesentlich zur humoralen Immunantwort beitragen [58, 108]. IL-10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin. IL-4 hemmt die körpereigene Bildung von T<sub>H</sub>1-Zellen sowie das von ihnen produzierte IFN-γ. IL-4 und IL-13 stimulieren B-Zellen und inhibieren die Aktivität von Makrophagen. Insbesondere IL-4 ist ein potenter Stimulator der Antikörperproduktion durch B-Zellen [6]. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die indirekte Präsentation von Alloantigenen durch B-Zellen für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der entscheidende Schritt für die Bildung von Alloantikörpern ist [9, 16, 58, 108].

#### 1.3.2.4 Antikörper

Alloantikörper sind sowohl in klinischen als auch in experimentellen Transplantatempfängern nachweisbar, die eine chronische Abstoßung erfahren [42, 44, 92, 108] und scheinen somit eine entscheidende Rolle für deren Pathogenese zu spielen. So kommt es nach allogener Herztransplantation in genetisch veränderten Mäusen mit ausgeschalteter B- und T-Zell-Immunantwort zu keiner Transplantatschädigung, während das passive Einbringen von Alloantikörpern mittels Injektion zur chronischen Abstoßung führt [25, 43, 97]. Da gebundene Antikörper nur schwer zu detektieren sind und in der Aktivierung des Komplementsystems resultieren, hat sich die Messung des Spaltprodukts C4d als Indikator für die humorale Abstoßung etabliert. C4d-Ablagerungen lassen sich in 60% aller Nierentransplantate nachweisen, die bereits fortgeschrittene Schädigungen der CAN zeigen [79], was eine Funktion von Antikörpern für ihre Genese vermuten lässt [60]. Alloantikörper können gegen MHC- oder nicht-MHC-Antigene des Transplantates gerichtet sein.

In den meisten Fällen sind Alloantikörper gegen MHC-I- oder MHC-II-Moleküle des Transplantates gerichtet [60]. Nach Nierentransplantation lassen sich in 12-60% der Transplantatempfänger zirkulierende anti-MHC-Antikörper nachweisen. Diese Beobachtung geht mit einem 5- bis 6-fach erhöhtem Risiko für eine chronische Abstoßung einher [1, 58, 93]. Zum Zeitpunkt der Abstoßung lassen sich in den meisten Fällen keine zirkulierenden anti-MHC-Antikörper nachweisen, was womöglich durch deren Bindung an MHC-Moleküle des Transplantates bedingt ist [58].

Weitere Antikörper können gegen Antigene von Endothelzellen [7], Mesangiumzellen [89] und Bestandteile der glomerulären Basalmembran (GBM) [57, 59] gerichtet sein. Anti-Endothelzell-Antikörper konnten bei 14% einer Gruppe von Nierentransplantatempfängern mit mindestens einem abgestoßenem Transplantat nachgewiesen werden, verglichen mit 3% einer Kontrollgruppe mit intakter Transplantatfunktion [91]. In Empfängern von Herztransplantaten konnten Antikörper gegen das Intermediärfilament Vimentin als Risikofaktor für die Entwicklung einer kardialen Transplantatvaskulopathie nachgewiesen werden [61]. Bisher ist jedoch nur wenig über anti-Endothelzell-Antikörper und ihre Zielantigene im Rahmen von chronischen Abstoßungen bekannt.

Joosten et al. [59] konnten in experimentellen F344→Lewis Nierentransplantationen zeigen, dass Transplantatempfänger 3 Wochen post transplantationem anti-GBM-Antikörper vom Typ Immunglobulin G1 (IgG1) gebildet hatten, was für eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort spricht. Diese waren gegen die Proteoglykane Perlecan und Agrin [57], die  $\alpha$ -5-Kette von Kollagen-Typ-IV und die  $\alpha$ -1-Kette von Kollagen-Typ-VI gerichtet und mit der Entwicklung einer chronischen Transplantatglomerulopathie (TGP) assoziiert.

Diese ist im Wesentlichen durch eine Dopplung der GBM charakterisiert und kann in ca. 20% aller klinischen Transplantate beobachtet werden, die eine chronische Abstoßung erfahren [69]. Zuvor konnte bereits nachgewiesen werden, dass Patienten mit TGP C4d-Ablagerungen an der GBM zeigen [89], was für eine vorhergehende Antikörperbindung spricht. In einer weiteren klinischen Studie konnten Joosten et al. [57] zeigen, dass das Vorkommen von anti-GBM-Antikörpern signifikant mit der Anzahl von Abstoßungen korreliert.

### 1.3.2.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und chronische Transplantatvaskulopathie

Die T<sub>H</sub>2-Immunantwort spielt sehr wahrscheinlich eine kritische Rolle in der Entstehung der interstitiellen Fibrose als weiteres Charakteristikum der CAN. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind proteolytische Enzyme, die am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Die typischen T<sub>H</sub>2-Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  inhibieren die Synthese von MMPs durch glatte Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) und Makrophagen [60, 70, 71, 86, 94, 108, 126]. Während IL-4 lediglich die Expression von MMPs durch Makrophagen inhibiert [70], fördert IL-10 zusätzlich die Expression des MMP-Inhibitors *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) [71]. Des Weiteren entfaltet IL-4 seine hemmende Wirkung auf die MMP-Expression auch in Fibroblasten [94], während die Wirkung von IL-10 zellspezifisch für Makrophagen ist [71]. TGF- $\beta$  und IL-4 können auch direkt eine verstärkte Expression extrazellulärer Matrix bewirken [60]. Im Tierversuch konnte eine Korrelation zwischen der Expression von T<sub>H</sub>2-Zytokinen, verminderter MMP-Expression und Organfibrose nachgewiesen werden [126].

Neben Glomerulopathie und interstitieller Fibrose ist die CAV ein weiterer wesentlicher Bestandteil der CAN. Hierbei führt eine Hyperplasie der arteriellen Intima und Media zu progredienter Minderdurchblutung des Transplantates und ischämischem Parenchymschaden. Die Pathogenese der CAV ist bisher nicht vollständig verstanden. Charakteristisch ist die Bildung einer Neointima durch die Ansammlung von  $\alpha$ -*smooth muscle actin* ( $\alpha$ -SMA)-positiven SMCs, die sich zwischen dem Endothel und der Lamina elastica interna ansammeln und dort extrazelluläre Matrix exprimieren [15]. Dies führt zu Gefäßversteifung und progredienter Lumenobliteration. Der Ursprung dieser  $\alpha$ -SMA-positiven SMCs ist nicht vollständig geklärt [15]. Unter bestimmten Voraussetzungen können SMCs der arteriellen Media jedoch zur Proliferation und Migration in die Intima stimuliert werden. So führt die Kreuzvernetzung von MHC-I-Molekülen auf humanen Endothelzellen und SMCs durch alloreaktive anti-MHC-I-Antikörper zu deren Migration [75, 145] und zur Expression proliferationsfördernder Gene wie z.B. *fibroblast growth factor receptor 1* (FGFR1), *platelet derived growth*

*factor* (PDGF) und *basic fibroblast growth factor* (bFGF) [12, 46, 75, 108]. Li et al. [75] konnten zeigen, dass die Bindung von alloreaktiven anti-MHC-I-Antikörpern an SMCs über einen *focal adhesion kinase* (FAK)-abhängigen intrazellulären Signalweg zu deren Migration und Proliferation führt, während die Genstilllegung von FAK mittels *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) sowohl Proliferation als auch Migration effektiv verhindert. In einem vergleichbaren Versuchsaufbau konnte zuvor gezeigt werden, dass diese Ergebnisse ebenfalls auf die durch anti-MHC-Antikörper induzierte Proliferation von Endothelzellen zutreffen [55]. Insbesondere die endotheliale Expression der Wachstumsfaktoren PDGF und bFGF wirkt stark chemotaktisch auf SMCs der Media und fördert somit deren Migration in die arterielle Intima [10, 47, 98, 132]. Entsprechend ist die kombinierte Gabe von anti-PDGF- und anti-bFGF-Antikörpern im experimentellen Modell mit einer deutlich signifikanten Reduktion der Intimadicke assoziiert [98]. Endothelzellen bilden nach Bindung von Antikörpern an MHC-I außerdem den Wachstumsfaktor VEGF, wodurch es zur autokrinen Stimulation der Zelle über den VEGF-Rezeptor-2 kommt [13], was wiederum zu Zellproliferation und womöglich auch zu erhöhter parazellulärer Permeabilität führt [13, 37]. Weitere Spenderzellen, die sich womöglich an der Bildung der Neointima beteiligen, sind Fibroblasten der arteriellen Adventitia, die nach Gefäßschädigung zu Myofibroblasten umdifferenzieren und in den subendothelialen Raum migrieren [107], sowie Endothelzellen, die sich in einem Vorgang, der als *endothelial to mesenchymal transition* (EndMT) bezeichnet wird [66], zu Myofibroblasten umdifferenzieren. Solche Zellen zeigen typische SMC-Merkmale, wie Kontraktilität,  $\alpha$ -SMA-Expression und chemotaktische Sensibilität gegenüber PDGF [66, 142]. Tierversuche weisen darauf hin, dass EndMT zu interstitieller Organfibrose beitragen kann [142]. Trotz bisher fehlender experimenteller Beweise ist es möglich, dass EndMT zur Pathogenese der CAV beiträgt.

Die bisher genannten Quellen von Zellen, die zur Pathogenese der CAV beitragen, entstammen alle dem Transplantat und somit dem Spender. Der Nachweis von zirkulierenden *smooth muscle progenitor cells* (SMPC) [112] und *endothelial progenitor cells* (EPC) [5] im peripheren Blut Erwachsener legt jedoch auch die Vermutung nahe, dass im Blut des Empfängers zirkulierende Vorläuferzellen zur Pathogenese der CAV beitragen. So könnten auch EPCs durch EndMT an der Bildung der Neointima beteiligt sein. Quaini et al. [96] untersuchten männliche Patienten, die das Herz einer weiblichen Spenderin transplantiert bekamen. Mittels Detektion des Y-Chromosoms konnte sicher zwischen Spender- und Empfängerzellen unterschieden werden. Hierbei konnte in 7-10% aller Zellen der Herzmuskulatur, der Koronarien und Kapillaren ein Y-Chromosom nachgewiesen werden. Diese Zellen zeigten starke proliferative Aktivität

und waren u.a. positiv für den Progenitorzellmarker Nestin. Weitere Studien zur Beteiligung von Empfängerzellen an der Pathogenese der CAV kommen jedoch zu unterschiedlichen Ergebnissen, die von einem Anteil von Empfänger-SMCs von 0% [14] bis 34% [40] reichen. Unter experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass sich mononukleäre Zellen zu SMCs umdifferenzieren können und dabei einen myeloiden Phänotyp, charakterisiert durch CD14<sup>-</sup> und CD68-Expression, beibehalten [80, 115]. Salama et al. [101] untersuchten insgesamt 50 Patienten mit transplantierten Herzen, von denen 25 Merkmale einer CAV aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass alle Patienten von Monozyten abstammende mesenchymale Progenitorzellen mit dem Phänotyp CD14<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD131<sup>-</sup>, CD141<sup>-</sup> aufwiesen, diese jedoch in Patienten mit CAV signifikant höhere proliferative Aktivität und  $\alpha$ -SMA-Expression aufwiesen.

Insgesamt erscheint es wahrscheinlich, dass sowohl Zellen des Spenders als auch des Empfängers am chronischen Gefäßumbau beteiligt sind. Insbesondere die Bedeutung von Empfängerzellen für die Pathogenese der CAV bedarf jedoch weiterer experimenteller Untersuchung.

## 1.4 Nestin

### 1.4.1 Proteineigenschaften

Nestin ist ein Typ-VI-Intermediärfilament, das erstmals 1990 durch Lendahl et al. [74] in neuroepithelialen Stammzellen (NSC) der Ratte beschrieben wurde und kurz darauf auch in humanen NSC nachgewiesen werden konnte [122]. Nestin ist ein Akronym für *neuroepithelial stem cell protein*. Es kann in glykosilierter oder unglykosilierter Form vorliegen [99]. Das Molekulargewicht beträgt für die glykosilierte Form 240 *kilodalton* (kDa) [39] bzw. 200-220 kDa für die unglykosilierte Form [39]. Jedoch konnten in verschiedenen Studien mittels Westernblot mit Antikörpern gegen Nestinproteine Nachweise mit sowohl höherem als auch niedrigerem Molekulargewicht erbracht werden. Die Ergebnisse reichen hierbei von 90 kDa [119] bis 280 kDa [11] und sind zum Teil wahrscheinlich auf Fragmente des Proteins zurückzuführen [99, 119].

Wie alle anderen Intermediärfilamente, weist Nestin eine zentrale  $\alpha$ -helikale Domäne auf [74]. Untypisch sind jedoch ein langer C-Terminus und ein kurzer N-Terminus [74]. Der N-Terminus von Intermediärfilamenten ist insbesondere für deren Aneinanderlagerung von Bedeutung. Der kurze N-Terminus ist womöglich dafür verantwortlich, dass Nestin nicht über die Fähigkeit zur Polymerisierung verfügt [50]. Es benötigt hierfür die Gegenwart anderer Intermediärfilamente [136] wie Vimentin [78] oder Desmin [113] mit denen es Heteromere bilden kann. Aufgrund des langen C-Terminus ist Nestin in der Lage mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli zu interagieren

[74], was die Vermutung nahe legt, dass es eine Funktion für die Koordination und/oder Regulation dieser Zellstrukturproteine ausübt [22]. Sahlgren et al. [99] konnten zeigen, dass Nestin einer zellzyklusabhängigen Phosphorylierung unterliegt. Eine geringe Phosphorylierung korreliert mit dem Filamentaufbau, während der Mitose liegt Nestin hingegen um ein Dreifaches häufiger in phosphorylierter Form vor [81, 99].

Park et al. [88] konnten zeigen, dass ein Nestin-*knockout* in der Maus zu einer embryonalen Letalität von ca. 90% führt. Jungtiere verstarben kurz nach der Geburt und waren signifikant kleiner als Tiere der Kontrollgruppe. NSC der *knockout*-Tiere waren nur eingeschränkt zur Selbsterneuerung fähig und gingen vermehrt in Apoptose. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei einem *knockout* des Intermediärfilamentes Vimentin zu keiner Polymerisierung von Nestin in NSC kam. Die immunhistologische Untersuchung solcher Zellen zeigte keine Färbung für Vimentin und eine Färbung für Nestin, das depolymerisiert erschien. Diese Daten weisen stark darauf hin, dass Vimentin essentiell für den Aufbau nestinhaltiger Filamente ist. NSC, in denen das Vimentin ausgeschaltet wurde, zeigten jedoch keine mit Nestin-*knockout* NSC vergleichbaren Defizite. Dies weist darauf hin, dass die vitale Funktion von Nestin unabhängig von dessen Integration in das Zytoskelett ist.

#### **1.4.2 Nestinexpression in embryonalen und adulten Geweben**

Die Funktion von Nestin ist bisher ungeklärt. Die erstmalige Entdeckung von Nestin in NSC führte zur Annahme, dass es ein spezifisches Markerprotein für NSC sei. Wiese et al. [136] konnten jedoch zeigen, dass Nestin nicht nur durch Vorläuferzellen neuroepithelialen Ursprungs exprimiert wird, sondern ein generelles Merkmal vieler, aber nicht aller Progenitorzellen ist. Wiese's Ergebnisse führten dazu, dass Nestin als Progenitorzellmarker angesehen wurde. Progenitorzellen sind Abkömmlinge embryonaler Stammzellen (ES), die allerdings nur über ein begrenztes Proliferationspotential verfügen. Sie haben die Fähigkeit sich in einen (unipotent) oder mehrere (multipotent) Zelltypen zu differenzieren, während sich pluripotente ES unbegrenzt in Zelltypen aller drei Keimblätter differenzieren können [136]. Aufgrund ihrer prinzipiell unbegrenzten Teilungsfähigkeit weisen ES ein hohes neoplastisches Potential auf, was für Progenitorzellen nicht zutrifft [136]. Im adulten Organismus sind Progenitorzellen in der Lage zur Regeneration gewebespezifischer Schäden.

Bisher konnten nestinexprimierende Zellen in zahlreichen Organen des embryonalen und adulten Organismus nachgewiesen werden. Während der Embryogenese konnte Nestin bspw. in Kardiomyozyten [62, 100], Skelettmuskelzellen [100, 105] und Endothelzellen [83, 100] nachgewiesen werden. Endotheliale Nestinexpression kann insbesondere während der Vaskularisierung embryonaler Organe beobachtet werden,

während eine endotheliale Nestinexpression im gesunden, adulten Gewebe nicht nachweisbar ist [82, 117]. Während der Angiogenese wird Nestin jedoch auch im adulten Organismus regelhaft durch das Endothel exprimiert [82, 117]. Die Nestinexpression nimmt mit zunehmender Zelldifferenzierung in den meisten Zellen ab [81]. Im adulten Organismus ist sie auf einige wenige Zellen beschränkt, die womöglich als Progenitorzellen fungieren können, wie adrenocorticale oder interstitielle Cajal-Zellen [123, 136]. Prinzipiell kann Nestinexpression im adulten Gewebe als ein selten zu beobachtendes Phänomen bezeichnet werden.

Unter pathologischen Bedingungen kann es in einer Vielzahl von Zellen, wie Hepatozyten, Skelettmuskelzellen und Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS) [136] zu einer Expression von Nestin kommen, was als Zeichen für Gewebeumbau bzw. der Rückkehr zu einem weniger differenzierten Zelltyp angesehen wird [123, 136]. Davidoff et al. [28] konnten am Tiermodell der Ratte zeigen, dass vaskuläre SMCs und Pericyten nach Injektion des zytotoxischen Ethan-Dimethyl-Sulfonat (EDS) zur Eliminierung der testikulären Leydigzellpopulation nestinpositiv werden und die zerstörte Leydigzellpopulation vollständig ersetzen. Nestinpositives Endothel kann auch in kardialen Infarktzone [82], sowie in Tumoren des ZNS beobachtet werden [26]. Toyhama et al. [122] konnten in einer Vielzahl von ZNS-Tumoren, insbesondere in Gliomen, eine Nestinexpression durch Tumorzellen nachweisen, welche mit der Malignität des Tumors korrelierte.

### **1.4.3 Renale Nestinexpression**

Embryologisch entwickeln sich die Glomeruli aus den sogenannten Nierenbläschen aus welchen zunächst ein einzelner S-förmiger Gang aussprosst (S-Phase) aus dem sich das gesamte Tubulussystem entwickelt, welches terminal in ein Sammelrohr mündet [84, 120]. Gegenüber der Aussprossung des S-Ganges nimmt das Nierenbläschen durch eine C-förmige Einstülpung Kontakt zu einem Kapillarnetz auf (C-Phase) und umschließt dieses letztendlich, abgesehen von einem ein- und austretendem Gefäß (Vas afferens und efferens), vollständig [84, 120]. Aus dem eingestülpten Nierenbläschen entwickelt sich die Bowmansche Kapsel mit dem kapillarfernen parietalen Blatt und dem kapillarnahen viszeralem Blatt, welches aus Podozyten besteht und sich dem kapillären Endothel vollständig anlegt [84, 120]. An der Kontaktzone von Endothel und Podozyten entsteht die GBM [84, 120]. Nestinpositive Zellen konnten während jeder Entwicklungsphase humaner Glomeruli nachgewiesen werden [11, 22]. Diese konnten während der S- und C-Phase durch Doppelfärbungen mit  $\alpha$ -SMA teilweise als Mesangiumzellen identifiziert werden [11]. Innerhalb des S-Ganges exprimierten nahezu alle Zellen Nestin und waren positiv für

den Endothelmarker CD34 [11]. Bis zum Eintreten der C-Phase nahm die Nestinexpression deutlich ab und es konnten nur noch wenige Zellen identifiziert werden, die sowohl CD34 als auch Nestin exprimierten [11]. Bei diesen Zellen handelte es sich nahezu ausschließlich um Podozyten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Nestin während der Organogenese der Niere durch Vorläuferzellen des tubulären Systems, Mesangiumzellen und Podozyten exprimiert werden kann. Podozyten sind die einzigen Zellen, die auch im adulten Organ konstante Nestinexpression aufweisen [11, 22]. In allen anderen Zellen nimmt die Expression mit zunehmender Zelldifferenzierung ab, bis sie letztlich nicht mehr nachweisbar ist. Da es keinerlei Hinweise darauf gibt, dass Podozyten als Vorläuferzellen fungieren können [11, 22], vermuteten Chen et al. [22], dass podozytäre Nestinexpression notwendig ist, um der besonderen mechanischen Beanspruchung, der Podozyten ausgesetzt sind, standzuhalten. Su et al. [114] konnten zeigen, dass die podozytäre Nestinexpression des Menschen während einer IgA Nephropathie, einer membranösen Glomerulonephritis oder einer fokal segmentalen Glomerulosklerose abnehmen kann. In experimentell herbeigeführten Nephropathien der Ratte konnte hingegen eine Zunahme der podozytären Nestinexpression nachgewiesen werden [146].

Eine Reexpression von Nestin konnte mehrfach unter verschiedenen pathologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Während der IgA-Nephropathie des Menschen konnte eine *de-novo* Nestinexpression durch peritubuläre Endothelzellen und tubulointerstitielle Myofibroblasten nachgewiesen werden [123]. Die Nestinexpression korrelierte signifikant mit zunehmender tubulointerstitieller Fibrose, steigendem Serumkreatinin, steigender Proteinurie und sinkender glomerulärer Filtrationsrate (GFR) [123]. Untersuchungen am Rattenmodell der unilateralen Ureterobstruktion konnten eine Nestinexpression in vornehmlich proximalen, aber auch distalen Tubuli und dem aufsteigenden Teil der Henleschleife nachweisen [100]. Auch hier korrelierte die Nestinexpression signifikant mit dem Grad der tubulointerstitiellen Fibrose. Übereinstimmend mit zuvor zitierten Studien exprimierten alle nestinpositiven Zellen auch Vimentin. Sammelrohre, die embryologisch nicht dem S-Gang entstammen, wiesen keine Nestinexpression auf. Des Weiteren konnte eine Nestinexpression durch interstitielle Zellen beobachtet werden, die nahezu alle durch Doppelfärbung mit Antikörpern gegen  $\alpha$ -SMA als Myofibroblasten identifiziert werden konnten [100]. Die Autoren vermuteten, dass die Nestinexpression tubulärer Zellen, womöglich den Prozess der EndMT widerspiegelt. Keine der nestinexprimierenden Zellen konnte zusätzlich mit dem Antikörper ED1 angefärbt werden, der Monozyten/Makrophagen nachweist. In kultivierten Tubuluszellen und renalen Fibroblasten konnte die Nestinexpression mittels Hypoxie oder TGF- $\beta$ -Gabe, einem potenten Stimulator von

Zellproliferation und -differenzierung, künstlich herbeigeführt werden [100]. Weder während der IgA-Nephropathie des Menschen [123], noch während der unilateralen Ureterobstruktion der Ratte [100] konnte ein Anstieg der Expression des Zellproliferationsmarker *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) beobachtet werden. Dies lässt die Proliferation nestinpositiver Zellen unter genannten Bedingungen unwahrscheinlich erscheinen. Ahn et al. [2] konnten zeigen, dass nestinpositive Zellen während der Cyclosporin-A-Nephropathie der Ratte in Arealen interstitieller Fibrose akkumulieren und vermuteten eine schnelle chemotaktische Migration nestinpositiver Progenitorzellen. Diese Vermutung konnten sie durch den Nachweis der zeitgleich vermehrten Expression von *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1), einem potenten Faktor der Stammzellmobilisation, untermauern. In dieser Studie exprimierten nestinpositive Zellen weder Vimentin noch Tubulus- oder Sammelrohrmarkerproteine. In einem experimentellen Modell des ischämischen Tubulusschadens in der Ratte [127] konnte bereits nach einem Tag ein deutlicher Anstieg nestinpositiver Zellen verzeichnet werden, der am zweiten Tag seinen Höhepunkt erreichte und nach drei Tagen wieder abrupt auf das Kontrollniveau abfiel. Zwei Wochen nach Reperfusion konnten Ansammlungen von interstitiellen nestin- und vimentinpositiven Zellen um geschädigte Tubuli herum nachgewiesen werden, von denen ausschließlich spindelförmige Zellen auch  $\alpha$ -SMA exprimierten. Die Autoren vermuteten ebenfalls EndMT als Ursprung dieser interstitiellen Myofibroblasten. Des Weiteren vermuteten sie zwei unterschiedliche Populationen interstitieller Myofibroblasten, da nicht alle  $\alpha$ -SMA-positiven Zellen auch Nestin exprimierten.

Der Ursprung und die Funktion nestinpositiver Zellen unter pathologischen Bedingungen ist weder in der Niere noch in anderen Organen abschließend geklärt und bedarf weiter Untersuchungen.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die CAN ist zurzeit der wesentliche limitierende Faktor des Langzeitüberlebens allogener Nierentransplantate. Zwei ihrer wesentlichen Merkmale sind der chronische Umbau der Transplantatgefäße, sowie die interstitielle Fibrosierung des transplantierten Organes. Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die Expression des Intermediärfilaments und Progenitorzellmarkers Nestin sowohl mit Vorgängen der Neovaskularisation und des Gefäßumbaus, als auch der interstitiellen Fibrose assoziiert ist. Es ist bisher nicht abschließend geklärt, ob nestinpositive Zellen von außen zum Ort des Geschehens einwandern, oder ob es sich um eine *de-novo* Expression ortsständiger Zellen handelt, die bspw. im Rahmen der EndMT einen neuen Phänotyp annehmen.

Da sowohl EndMT als auch von außen einwandernde Progenitorzellen im dringenden Verdacht stehen zur CAN beizutragen, ist es von Interesse allogene Nierentransplantate auf ihre Nestinexpression hin zu untersuchen. Wir haben hierfür allogene (F344 auf Lewis) und isogene (Lewis auf Lewis) Nierentransplantationen in der Ratte durchgeführt, um zwischen immunologischen und operativ bedingten Schädigungen unterscheiden zu können. Das hier verwendete Modell der chronischen Abstoßung F344→Lewis ist ein etabliertes und gut untersuchtes Modell der CAN, das der Abstoßung humaner Nierentransplantate sehr nahe kommt.

Die Transplantate wurden zu charakteristischen Zeitpunkten der Abstoßung mittels Immunhistochemie, Westernblot und *real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) auf ihre Nestinexpression hin untersucht.

In dieser Arbeit soll die Hypothese überprüft werden, dass der Nestinproteingehalt der Niere nach allogener Transplantation gegenüber isogener Transplantation signifikant erhöht ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Reagenzien

Aceton reinst (Roth, Karlsruhe: CP40.1)

Acrylamidlösung Rotiphorese 30% (Roth, Karlsruhe: 3037.1)

Agarose *UltraPure*<sup>TM</sup> (Invitrogen, Barcelona, Spanien: 15510-019)

Alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase (APAAP) aus der Maus, monoklonal (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark: D0651)

Ammoniumperoxidsulfat p.a. (Roth, Karlsruhe: 9592.3)

Ampicillin ratiopharm 0,5 g/5 ml (Ratiopharm, Ulm)

Aqua destillata (Aqua dest.) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen: 8483A101)

Bovines Serumalbumin (BSA), *bovine fraction V* (Serva, Heidelberg: 11930)

Chlorbleiche, Natriumhypochloritlösung 12% (Roth, Karlsruhe: 9062.3)

Chloralhydrat (Merck, Darmstadt: 1.02425.1000)

3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) (Sigma-Aldrich, Steinheim: D5905)

Dimethylformamid (Merck, Darmstadt: 1.030.34)

*DNA Loading Dye (6 x)* (Fermentas, St. Leon-Rot: R0611)

*DNA Ladder 100 bp*, Molekulargewichtsstandard (Promega, Madison, Wisconsin, USA: 18149204)

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) p.a. (Serva, Heidelberg: 11280)

Essigsäure 100%, Eisessig p.a. (Merck, Darmstadt: 1.00063.1011)

Ethanol (Sigma-Aldrich, Steinheim: 32205)

Ethidumbromid 1% (Roth, Karlsruhe: 2218.1)

*Fast-Blue BB Salt* (Sigma-Aldrich, Steinheim: F-3378)

GATC-Böxle<sup>TM</sup> (GATC Biotech, Konstanz)

Glycergel *mounting medium* (Dako Cytomation, Carpinteria, California, USA: C0563)

Glycin p.a. (Roth, Karlsruhe: 3908.2)

Glyzerin (Sigma-Aldrich, Steinheim: G-2025)

Hämatoxylin (Merck, Darmstadt: 15938)

Heparin ratiopharm 25000 IE/5 ml (Ratiopharm, Ulm)

*Hexanukleotid random primer mix* 15,3 pmol/µl (Roth, Karlsruhe: HP28.1)

Isopropanol (Sigma-Aldrich, Steinheim: 33539-5.5)

Levamisol, Tetramisolhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim: F-3378)

Kalialaun p.a. (Merck, Darmstadt: 1042)

Kaliumchlorid p.a. (Merck, Darmstadt: 1.04936.1000)

Kaliumdihydrogenphosphat p.a. (Merck, Darmstadt: 1.04873.0250)  
*Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche Diagnostics, Mannheim: 12015200001)  
2-Mercaptoethanol *pure liquid* (Sigma-Aldrich, Steinheim: M6250)  
Methanol 100% p.a. (Sigma-Aldrich, Steinheim: 32213)  
*Micro-BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent Kit* (Pierce, Rockford, Illinois, USA: 23235)  
Milchpulver *blotting grade* (Roth, Karlsruhe: T145.3)  
*M-MLV RT Buffer* (Promega, Madison, Wisconsin, USA: M531A)  
*M-MLV RT, RNase H(-) Point Mutant 200 u/μl* (Promega, Madison, Wisconsin, USA: M368B)  
NaCl-Lösung 0,9% (B. Braun Melsungen AG, Melsungen: 8033A101)  
Naphthol-AS-MX-Phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim: N-4875)  
Natriumazid, NaN<sub>3</sub> reinst (Merck, Darmstadt: 1.06688.0100)  
Natriumchlorid, NaCl p.a. (Roth, Karlsruhe: 3957.1)  
Natriumhydrogensulfat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O p.a. (Merck, Darmstadt: 1.06580.1000)  
Natriumhydroxid, NaOH 1 mol/l (Merck, Darmstadt: 1.09137.1000)  
Normalrattenserum (Harlan-Winkelmann, Borcheln)  
*PCR Nucleotide Mix* (Promega, Madison, Wisconsin, USA: C114H)  
Pentobarbital-Na, Narcoren®, 160 mg/ml (Merial, Hallbergmoos)  
Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) aus der Maus (Rockland Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, USA: P200-0025)  
Pertex (Medite, Burgdorf: PER30000)  
*Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen, Darmstadt: 11733-046)  
Primärantikörper. Anti-CD68-artig-Immunglobulin aus der Maus, monoklonal (Serotec, Oxford, England: MCA-341)  
Primärantikörper. Anti-Nestin-Immunglobulin aus der Maus, monoklonal (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA: MAB353)  
Primärantikörper. Anti-Lamin A/C aus der Maus, monoklonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA: SC56140)  
Proteaseinhibitortablette *Complete® Mini* (Roche Diagnostics, Mannheim: 1836153)  
PVD-Membran, *Immobilon®-P Transfer Membrane* (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA: IPVH00010)  
*Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden: 74104)  
rRNasin® RNase Inhibitor 40 u/μl (Promega, Madison, Wisconsin, USA: N251B)  
Salzsäure, HCL 1 N (Merck, Darmstadt: 1.09057.1000)  
SDS (*Sodium Dodecyl Sulfat*) *UltraPure* (Roth, Karlsruhe: 2326.2)  
Sekundärantikörper. Anti-Maus-Immunglobulin aus dem Kaninchen, peroxidase markiert, polyklonal (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark: P0161)

Sekundärantikörper. Anti-Maus-Immunglobulin aus dem Kaninchen, polyklonal (Dako Denmark, Glostrup, Dänemark: Z0259)

Silan, 3-Aminopropyltriethoxysilan 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim)

TEMED (Tetramethylethyldiamin) p.a. (Roth, Karlsruhe: 2367.3)

TRIS- (Trishydroxymethylaminomethan) Base 99,9% (Sigma-Chemical, St. Louis, Missouri, USA: T-1503-1)

TRIS-HCl (Sigma-Aldrich, Steinheim: T-3253)

Tween 20 p.a. (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn: 8.22184.0500)

Voll-entsalztes (VE-) Wasser (Universitätsklinikum Gießen)

Wasserstoffperoxid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Merck, Darmstadt: 1.07209.1000)

Xylol reinst (Merck, Darmstadt: 1.08685.2500)

Zitronensäure-Monohydrat p.a. (Merck, Darmstadt: 1.0024.0500)

### 2.1.2 Geräte und Materialien

*AlphaEase FC Software* v.3.3.0 (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, Kalifornien, USA)

Blotting-Apparatur (Keutz Labortechnik, Reiskirchen)

Digitalkamera Olympus C-4000 Zoom (Olympus, Tokio, Japan)

*FLUOstar OPTIMA Software* v.1.30.0 (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg)

Gewebemühle MM 301 (Retsch GmbH, Haan)

Mikroskop Olympus BX511F (Olympus, Tokio, Japan)

Mikrotom Microm HM560 (Microm GmbH, Walldorf)

Spektralphotometer NanoDrop 1000 (peqlab Biotechnologie, Erlangen)

*StepOne Real-Time-PCR System* (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Plattenspektralphotometer FLUOstar OPTIMA (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg)

*Thermo Scientific Hybaid PCR Sprint Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Zentrifuge Mikro 200R (Hettich, Tuttlingen)

### 2.1.3 Lösungen

Folgende Lösungen wurden verwendet.

<b>Ammoniumperoxidsulfat-Lösung</b>	Es wurden 2 g Ammoniumperoxidsulfat in 8 ml Aqua dest. gelöst.
<b>Ethidiumbromidlösung (1%)</b>	10 µl Ethidiumbromidstammlösung wurden mit 200 ml TRIS-Acetat-EDTA (TAE) vermischt.
<b>Fast-Blue Färbelösung</b>	1 mg <i>Fast Blue BB Salt</i> wurde in 1 ml Naphtol-AS-MX-Phosphat Puffer gelöst.
<b>Hämalaunlösung</b>	In 1 l VE-Wasser wurden gelöst: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 g Hämatoxylin</li> <li>• 0,2 g Natriumiodat</li> <li>• 50 g Kalialaun</li> </ul> Nach 24 Stunden wurden 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zugegeben. Die Lösung wurde unter ständigem Rühren 5 Minuten erhitzt und anschließend filtriert. In dieser Arbeit wurde eine 1:10 mit VE-Wasser verdünnte Lösung verwendet.
<b>Laufpuffer</b>	Zu 100 ml 10%iger SDS-Stammlösung wurden gegeben <ul style="list-style-type: none"> <li>• 30,4 g TRIS-Base</li> <li>• 144,2 g Glycin</li> </ul> Im Anschluss wurde mit VE-Wasser auf 10 l aufgefüllt.
<b>Naphtol-AS-MX-Phosphat-Puffer</b>	2 mg Naphtol-AS-MX-Phosphat wurden in 200 µl Dimethylformamid gelöst und zusammen mit 4,8 mg Levamisol zu 9,8 ml TRIS-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 8,2) gegeben.

<b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b> <b>(10 x Stammlösung)</b>	<p>In 1 l VE-Wasser wurden gelöst:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 80 g NaCl (1,37 mmol/l)</li> <li>• 14,24 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (80 mmol/l)</li> <li>• 2 g KCl (27 mmol/l)</li> <li>• 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 mmol/l)</li> </ul> <p>Eine 1 x Lösung wurde durch 1:10 Verdünnung der Stammlösung mit VE-Wasser hergestellt.</p>
<b>Phosphate Buffered Saline (PBS)</b> <b>(1 x Gebrauchslösung)</b>	<p>Die 10 x Stammlösung wurde 1:10 mit VE-Wasser verdünnt und mit verdünntem HCl auf pH 7,2 eingestellt.</p>
<b>PBS/BSA</b>	<p>Es wurde 1 g bovines Serumalbumin (BSA) in 20 ml PBS gelöst.</p>
<b>PBS/BSA/Azid</b>	<p>In 20 ml PBS wurden gelöst:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,02 g NaN<sub>3</sub></li> <li>• 0,2 g BSA</li> </ul>
<b>Peroxidasesubstratlösung</b>	<p>1 mg 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) wurde in 20 ml TBS gelöst. Anschließend wurde jeweils 1 ml der Lösung in Eppendorfgefäße pipettiert, die bei -20 °C eingefroren wurden. Unmittelbar vor Gebrauch wurden pro 1 ml DAB-Lösung 10 µl einer 1,2%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung hinzugegeben.</p>

<b>Probenpuffer (vollständig)</b>	<p>Probenpuffer setzte sich zu 3 Teilen aus Probenpuffer I und zu einem Teil aus Probenpuffer II zusammen. Daraus ergibt sich folgende Zusammensetzung:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,625 ml 1 mol/l TRIS-HCl-Puffer (pH 6,8)</li> <li>• 1 ml Glyzerin</li> <li>• 2,3 ml 10%ige SDS-Stammlösung</li> <li>• 0,4 ml 2-Mercaptoethanol</li> <li>• 5,675 ml Aqua dest.</li> <li>• 1 Proteaseinhibitortablette</li> </ul>
<b>Probenpuffer I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,625 ml TRIS-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 6,8)</li> <li>• 2,3 ml 10%ige SDS-Stammlösung</li> <li>• 7,075 ml Aqua dest.</li> <li>• 1 Proteaseinhibitortablette</li> </ul>
<b>Probenpuffer II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0,625 ml TRIS-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 6,8)</li> <li>• 4 ml Glyzerin</li> <li>• 2,3 ml 10%ige SDS-Stammlösung</li> <li>• 0,8 ml 2-Mercaptoethanol</li> <li>• 1,475 ml Aqua dest.</li> <li>• 1 Proteaseinhibitortablette</li> </ul>
<b>Sammelgelpuffer</b>	<p>6,06 g TRIS-Base wurden in 70 ml VE-Wasser gelöst und mit 1 N HCL auf pH 6,8 eingestellt. Darauf wurden 4 ml 10%ige SDS-Stammlösung zugegeben und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.</p>

<b>TRIS-Acetat-EDTA (TAE) (50 x Stammlösung)</b>	In 100 ml EDTA-Lösung (0,5 mol/l, pH 8) wurden 242 g TRIS-Base gelöst und 57,1 ml Essigsäure hinzugegeben. Im Anschluss wurde mit VE-Wasser auf 1 l aufgefüllt.
<b>Transferpuffer</b>	In 1,5 l VE-Wasser wurden gelöst: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 9 g TRIS-Base</li> <li>• 43 g Glycin</li> </ul> Im Anschluss wurden 15 ml 10%ige SDS-Stammlösung und 600 ml Methanol zugegeben und mit VE-Wasser auf 3 l aufgefüllt.
<b>Trenngelpuffer</b>	Es wurden 18,16 g TRIS-Base in 70 ml Aqua dest. gelöst. Mit 1 N HCL wurde auf pH 8,8 eingestellt und nach Zugabe von 10%iger SDS-Stammlösung wurde mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
<b>TRIS Buffered Saline (TBS)</b>	In 900 ml VE-Wasser wurden gelöst: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 6,05 g TRIS-Base (50 mmol/l)</li> <li>• 9 g NaCl (154 mmol/l)</li> </ul> Anschließend wurde mit 5% HCl auf pH 7,6 eingestellt und mit VE-Wasser auf 1 l aufgefüllt.
<b>TRIS-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 6,8)</b>	In 10 ml VE-Wasser wurden 1,576 g TRIS-HCl gelöst und mit ca. 800 µl 1 N NaOH wurde auf pH 6,8 eingestellt.
<b>TRIS-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 8,2)</b>	In 800 ml VE-Wasser wurden 12,1 g TRIS-Base gelöst und mit ca. 50 ml 1 N HCl auf pH 8,2 eingestellt. Anschließend wurde mit VE-Wasser auf 1 l aufgefüllt.
<b>Zitratpuffer (0,3 mol/l, pH 6)</b>	In 3,9 l VE-Wasser wurden gelöst: <ul style="list-style-type: none"> <li>• 8,4 g Zitronensäure-Monohydrat</li> <li>• 100 ml NaOH</li> </ul>

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Transplantation**

#### **2.2.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten männliche Ratten der Stämme Lewis und F344 der Firma Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland), sowie männliche Ratten des Stammes Lewis der Firma Elevage Janvier (Le Genest St. Isle, Frankreich). Sowohl die Versorgung der Tiere als auch die durchgeführten Experimente erfolgten in Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach den Richtlinien des *National Institute of Health* (NIH). Für Nierentransplantationen mussten die Tiere ein Gewicht von 250-300 g aufweisen. Für allogene Transplantationen wurden Nieren vom Rattenstamm F344 in Lewis-Ratten implantiert. Isogene Transplantationen erfolgten innerhalb des Rattenstammes Lewis und dienten als Kontrolle für operativ bedingte Schäden. Zusätzlich dienten Nieren unbehandelter Lewis-Ratten als Kontrollen.

#### **2.2.1.2 Transplantationen von Rattennieren**

Die Durchführung der Transplantationen erfolgte freundlicherweise durch Frau Prof. Dr. Grau im Wesentlichen nach der von Fabre et al. etablierten Methode [33]. Sowohl Transplantat Spendern (Lewis oder F344) als auch Transplantatempfängern (Lewis) wurden präoperativ 60 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Spender wurden zusätzlich mit 60 µl Heparin i.v. antikoaguliert. Nach der Entnahme der Spenderniere erfolgte die orthotope Implantation mit schrittweiser End-zu-End-Anastomisierung von Arteria und Vena renalis. Um die warme Ischämiezeit möglichst kurz zu halten, wurde der Blutfluß noch vor Durchführung der Ureteranastomose wiederhergestellt. Abschließend erfolgte die kontralaterale Nephrektomie des Empfängers mit Ligation des Ureters sowie von Arteria und Vena renalis. Transplantatempfänger erhielten postoperativ eine intraperitoneal applizierte Infektionsprophylaxe mit 300 µl Ampicillin. Auf eine immunsuppressive Behandlung wurde verzichtet.

#### **2.2.1.3 Einfrieren**

Die entnommenen Nieren wurden mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten, so dass jedes Stück Cortex und Medulla enthielt. Die Nierenteile wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in ein Gefrierrohrchen gebracht und in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.2.2 Immunhistologie

### 2.2.2.1 Silanisierung der Objektträger

Das Silanisieren ermöglicht das Haften von Gewebeschnitten auf Objektträgern.

Das Silanisieren der verwendeten Objektträger beinhaltet nacheinander folgende Schritte:

1. Reinigung in 5% HCl über Nacht
2. 5 Minuten waschen in einer Küvette mit VE-Wasser
3. 5 Minuten waschen in einer Küvette mit 100% Isopropanol
4. 30 Minuten trocknen bei Raumtemperatur (RT)
5. 5 Minuten in 2% Silan in Aceton
6. Trocknen der Objektträger über Nacht bei ca. 60 °C im Wärmeschrank

### 2.2.2.2 Anfertigung der Gewebeschnitte

Aus den in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Organpräparaten wurden am Kryostat Schnitte von 7 µm Dicke angefertigt. Jeweils drei solcher Schnitte wurden auf einen silanisierten Objektträger aufgetragen und anschließend bei -20 °C im Kryostat für 10 Minuten in Isopropanol fixiert und anschließend für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die fixierten Gewebeschnitte wurden anschließend mit einem Diamantschreiber umrundet.

### 2.2.2.3 Einzelfärbung

Für Einzelfärbungen wurde folgender Primärantikörper verwendet:

Name	Hersteller	Zielantigen	Klonalität	Spezies	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
MAB-353	Millipore	Nestin	monoklonal	Maus	1:100	60 Minuten bei RT

Tab. 1: Antikörper für Einzelfärbungen

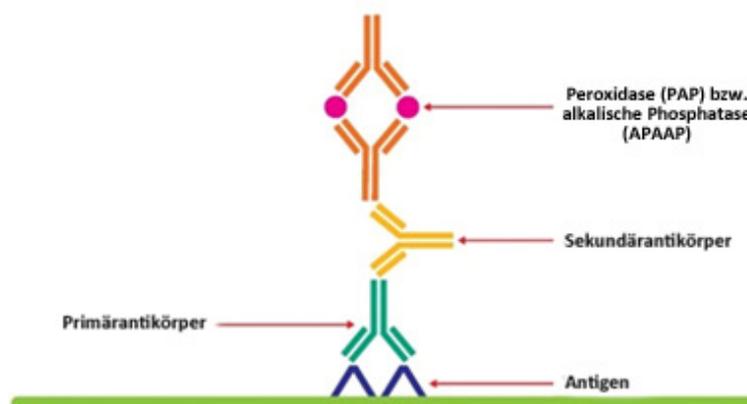
Für den immunhistochemischen Nachweis wurde ein Peroxidase-basierendes Verfahren angewandt. In einem ersten Schritt erfolgte die Inaktivierung der endogenen Peroxidase in einer 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (3,3 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf 96,7 ml PBS) auf Eis. Nachdem die Objektträger 30 Minuten in dieser Lösung verblieben waren, wurden sie dreimal 2 Minuten in einer Küvette mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Schnitt 40 µl des mit PBS/BSA/Azid verdünnten Primärantikörpers aufpipettiert. Die Antikörperinkubation erfolgte für 60 Minuten bei RT. Auf Kontrollen wurde lediglich PBS/BSA/Azid pipettiert. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Abspülen mit PBS entfernt. In einem darauffolgenden Schritt wurden

jeweils 40 µl eines gegen Maus-Immunglobuline gerichteten Sekundärantikörpers aus dem Kaninchen aufgetragen. Um Kreuzreaktionen mit Rattenimmunglobulinen zu vermeiden, wurden dem 1:25 mit PBS verdünnten Sekundärantikörper 5% Normalrattenserum zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei RT. Nicht gebundene Antikörper wurden anschließend durch dreimaliges Abspülen mit PBS entfernt.

Anschließend wurden je 40 µl eines Peroxidase-anti-Peroxidase-Komplexes (PAP) aus der Maus in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS aufgetragen. Um Kreuzreaktionen mit Rattenantigenen zu vermeiden und unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden zusätzlich 10% Normalrattenserum zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT wurde nicht gebundenes PAP durch dreimaliges Spülen mit TBS entfernt.

Da sich nun an den gebundenen Primärantikörpern ein Komplex bestehend aus Sekundärantikörper und PAP befand (siehe Abb. 1), konnte die Peroxidaseaktivität durch Zugabe von Peroxidasesubstratlösung sichtbar gemacht werden. Pro Schnitt wurden 50 µl der Peroxidasesubstratlösung aufgetragen und während einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT umgesetzt, wodurch sich ein brauner Farbton ergab. Nicht umgesetztes DAB wurde durch dreimaliges Spülen mit PBS entfernt. Überschüssiges DAB wurde mit Chlorbleiche oxidiert. Die Schnitte wurden anschließend in einer Küvette mit PBS belassen.

### Indirekter Antikörpernachweis mittels 3-Schritt Methode



**Abb. 1:** Indirekter Antikörpernachweis mittels Peroxidase-anti-Peroxidase bzw. alkalische-Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase.  
(DAKO Education guide – Immunohistochemical Staining Methods, 5<sup>th</sup> Edition, S. 57. Mit freundlicher Genehmigung der Firma DAKO.)

#### 2.2.2.4 Gegenfärbung

Eine Kerngegenfärbung erfolgte für 90 Sekunden in 1:10 verdünntem Hämalaun. Danach wurden die Schnitte in VE-Wasser gespült und 5 Minuten in Leitungswasser gebläut. Anschließend wurde nochmals kurz mit VE-Wasser gewaschen.

#### 2.2.2.5 Entwässerung und Eindecken

Die Entwässerung der mit DAB gefärbten Schnitte erfolgte in einer Reihe aufsteigender Alkoholkonzentrationen wie folgt:

1. 3 Minuten VE-Wasser
2. 3 Minuten 50% Isopropanol
3. 3 Minuten 70% Isopropanol
4. 3 Minuten 80% Isopropanol
5. 3 Minuten 90% Isopropanol
6. 3 Minuten 100% Isopropanol
7. 2 mal 3 Minuten Xylol

Im Anschluss wurde mit Pertex eingedeckt.

#### 2.2.2.6 Doppelfärbungen

Der monoklonale Antikörper ED 1 erkennt ein CD68-artiges makrophagen-/monozytenspezifisches Antigen. Um zu prüfen, ob CD68-artig-positive Zellen Nestin exprimieren, wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Hierfür wurden folgende Primärantikörper verwendet:

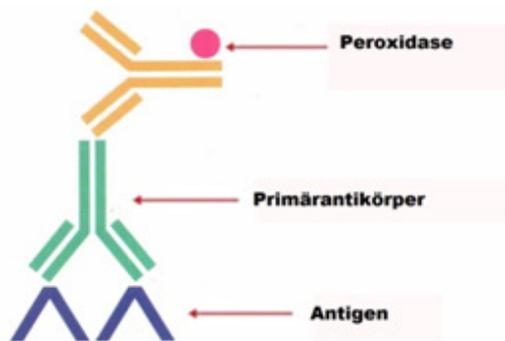
Name	Hersteller	Zielantigen	Klonalität	Spezies	Verdünnung	Inkubationsbedingungen
MAB-353	Millipore	Nestin	monoklonal	Maus	1:100	60 Minuten bei RT
MCA-341	Serotec	CD68-artig	monoklonal	Maus	1:500	60 Minuten bei RT

Tab. 2: Antikörper für Doppelfärbungen

Zunächst wurden am Kryostat Gewebeschnitte von 5 µm Dicke angefertigt, hierfür wurde wie bereits unter 2.2.2.1 und 2.2.2.2 beschrieben vorgegangen. Bis einschließlich des Abspülens des Primärantikörpers wurde verfahren wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Für Doppelfärbungen wurde ein direkt mit Peroxidase markierter Sekundärantikörper aus dem Kaninchen gegen Immunglobuline der Maus verwendet (siehe Abb. 2), welcher 1:70 mit PBS und 5% Normalrattenserum verdünnt wurde. Es wurden pro Schnitt 50 µl des Sekundärantikörpers aufpipettiert. Die Inkubation erfolgte

für 60 Minuten bei RT. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit DAB wie unter 2.2.2.3 beschrieben. Danach wurden die Objektträger für 2 Minuten in Zitratpuffer im Dampfkochtopf gekocht und nach Abkühlen dreimal 2 Minuten in PBS gewaschen. Darauf erfolgte zunächst das Auftragen eines Primärantikörpers und im Anschluss des Sekundärantikörpers unter den gleichen Bedingungen wie für Einzelfärbungen. Für Doppelfärbungen wurde der Sekundärantikörper dreimal mit TBS abgespült, bevor je Schnitt 50 µl eines alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase-Komplexes (APAAP) in einer Verdünnung von 1:25 mit PBS und 5% Rattenserum aufgetragen wurde (siehe Abb. 1). Nach 30 Minuten Inkubation bei RT wurde nicht gebundenes APAAP mit TRIS-HCl-Puffer (1 mol/l, pH 8,2) abgespült und je Schnitt 50 µl *Fast-Blue*-Färbelösung aufgetragen. Diese enthielt 2 mmol/l Levamisol um endogene Phosphataseaktivität zu inaktivieren. Die alkalische Phosphatase (AP) des APAAP-Komplexes wird hingegen nicht durch Levamisol beeinflusst. Die Umsetzung der *Fast-Blue*-Färbelösung erfolgte für 20 Minuten bei RT im Dunkeln und ergab einen blauen Farbton. Aufgrund des alkohollöslichen Produktes bei AP-Nachweis erfolgte keine Entwässerung. Die Objektträger wurden für 1 Stunde in PBS belassen, um nicht umgesetztes Substrat zu entfernen. Im Anschluss erfolgte das Eindecken mit Glycergel.

### Indirekter Antikörpernachweis mittels 2-Schritt Methode



**Abb. 2:** Indirekter Antikörpernachweis mittels peroxidasemarkiertem Sekundärantikörper. (DAKO Handbuch – Immunhistochemische Färbemethoden, 3. Auflage, S. 34. Mit freundlicher Genehmigung der Firma DAKO.)

## 2.2.3 Nachweis von nestincodierender mRNA in experimentellen Nierentransplantaten

### 2.2.3.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung von *ribonucleic acid* (RNA) aus schockgefrorenen Nierentransplantaten erfolgte mit Hilfe des *Rneasy Mini Kit* entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte anschließend mit Hilfe eines Spektralphotometers.

### 2.2.3.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Zur Durchführung einer PCR ist eine *desoxyribonucleic acid* (DNA)-Matrize erforderlich. Daher musste die zuvor isolierte mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Die Kombination aus PCR und vorangehender cDNA-Synthese wird als reverse-Transkriptase-PCR bezeichnet.

Die cDNA-Synthese erfolgte in zwei Schritten:

1. RNA und *random hexamer primer* wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Das Volumen wurde anschließend mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten auf 70 °C erwärmt. Anschließend wurde für weitere 5 Minuten eine Temperatur von 4 °C gehalten.
2. Dem Reaktionsansatz aus Schritt 1 wurden jeweils 15 µl eines *mastermix* hinzugegeben, wodurch sich ein Gesamtvolumen von 25 µl ergab. Der *mastermix* setzte sich wie folgt zusammen:

<i>Reagenz</i>		<i>Volumen</i>
RNase-Inhibitor	40 u/µl	0,5 µl
Reverse Transkriptase	200 u/µl	0,5 µl
Desoxynukleotidtriphosphat	10 mmol/l	1,5 µl
<i>M-MLV RT Buffer</i>		5 µl
H <sub>2</sub> O		7,5 µl

Tab. 3: Zusammensetzung des *mastermix*

Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für 10 Minuten auf 25 °C erwärmt. Anschließend erfolgte bei 40 °C für 60 Minuten die cDNA-Synthese durch die reverse Transkriptase. Darauf wurde zunächst für 15 Minuten eine Temperatur von 70 °C gehalten und anschließend für ebenfalls 15 Minuten eine Temperatur von 4 °C. Nach Ablauf dieser Schritte war das Umschreiben von RNA in cDNA beendet.

### 2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung eines definierten Teiles eines DNA-Stranges *in vitro*. Während eines sich mehrfach wiederholenden Reaktionszyklus kommt es jeweils zu einer Verdopplung eines spezifischen DNA-Abschnittes.

Der hierfür benötigte Reaktionsansatz enthielt die zuvor synthetisierte cDNA, synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*forward* und *reverse primer*), die Anfang und Ende der Zielsequenz markieren, sowie *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG*, welcher wiederum eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und *SYBR® Green I Dye* enthielt. Bei letzterem handelt es sich um eine fluoreszierende Färbelösung, die direkt an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet. Die Färbelösung generiert ein Signal proportional zur DNA-Konzentration, welches von real-time-PCR-Maschinen gemessen werden kann. Als Negativkontrollen dienten Reaktionsansätze, denen keine cDNA zugefügt wurde.

Der PCR-Prozess besteht prinzipiell aus drei Schritten, die in einem Thermocycler stattfinden und sich 12-50 mal wiederholen:

1. *Denaturierung (Melting)*

Bei 94 °C kommt es zur Trennung der dsDNA in DNA-Einzelstränge.

2. *Primerhybridisierung (Annealing)*

Während des *annealing* binden die *primer* spezifisch an die einsträngige DNA. Das Temperaturoptimum ist abhängig von ihrem mittleren Schmelzpunkt. Die gebundenen *primer* enthalten einen Startpunkt für die DNA-Synthese.

3. *Elongation (Extension)*

Während der Elongation synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) ausgehend von den gebundenen *primern* in 5'-3'-Richtung durch Hinzufügen freier Nucleotide einen komplementären DNA-Strang. In dieser Arbeit wurde eine Extensionstemperatur von 72 °C verwendet.

Im Folgenden sind die verwendeten *primer* samt Produktlängen, Reaktionsbedingungen und Genbanknummern aufgelistet. Die Synthese der *primer* erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland)

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>	<b>Reaktionsbedingungen</b>			
		<i>Accession-Nummer</i>	MgCl <sub>2</sub>	<i>Annealing</i>	Produktlänge
Nestin <i>for</i>	GATCGCTCAGATCCTGGAAG	NM_012987.1	2 mmol/l	60 °C	118 bp
Nestin <i>rev</i>	AGGTGTCTGCAACCGAGAGT				
PBGD <i>for</i>	GGCGCAGCTACAGAGAAAGT	NM_013168.1	2 mmol/l	60° C	114 bp
PBGD <i>rev</i>	AGCCAGGATAATGGCACTGA				

**Tab. 4:** Primer mit Reaktionsbedingungen

#### 2.2.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Während der Agarose-Gelelektrophorese durchlaufen DNA-Fragmente ein elektrisches Feld. Agarose wirkt dabei wie ein molekulares Sieb. Je größer die Agarosekonzentration gewählt wird, desto kleiner ist die Porenweite des Gels, wodurch eine langsamere Wanderung der DNA-Fragmente im Gel erreicht wird. Eine geringere Agarosekonzentration geht hingegen mit größerer Porenweite einher, wodurch eine schnellere Wanderung der DNA-Fragmente erreicht wird. Zum Nachweis von nestincodierenden DNA-Fragmenten wurde eine Agarosekonzentration von 1% gewählt. Hierfür wurden 100 ml TAE mit 1 g Agarose versetzt und dreimal in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Im Anschluss wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen, in dem für ca. 15 Minuten die Auskühlung und Aushärtung des Gels erfolgte. Anschließend wurden in eine Geltasche 10 µl eines Molekulargewichtsstandards pipettiert. Den PCR-Produkten wurden pro 8 µl Probenvolumen 2 µl *DNA loading dye* zugesetzt, so dass insgesamt 10 µl pro Geltasche pipettiert wurden. Die Auftrennung erfolgte für 30 Minuten in TAE-Puffer bei 120 V. Anschließend erfolgte eine Färbung des Gels für 15 Minuten in einer 1%igen Ethidiumbromidlösung. Die Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht (322 nm) sichtbar gemacht und mit einer Digitalkamera dokumentiert.

#### 2.2.3.5 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die Sequenzierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte erfolgte durch die Firma GATC-Biotech AG (D-78467 Konstanz). Hierfür wurde das „GATC-Böxle“ verwendet und entsprechend der Angaben des Herstellers verfahren. Zuvor wurde die entsprechende Bande mittels UV-Licht sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten.

## 2.2.4 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

### 2.2.4.1 Probenaufbereitung

Zur Durchführung einer Gelelektrophorese war es erforderlich den Proben Probenpuffer zuzufügen.

Es wurden zunächst ungefähr 20 mg des in Stickstoff schockgefrorenen Nierengewebes abgewogen und mit 100 µl Probenpuffer I in ein Eppendorfgefäß gebracht. Probenpuffer I enthält weder Mercaptoethanol noch Glycerin, da beides die nachfolgende Proteingehaltsbestimmung verfälschen würde. Das Eppendorfgefäß wurde anschließend mit dem enthaltenem Gewebe und Probenpuffer I, sowie einer Stahlkugel erneut in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wurden die Proben zuerst 3 Minuten mittels Gewebemühle homogenisiert, dann 5 Minuten bei 95 °C im Wärmeblock erhitzt und zuletzt 5 Minuten bei 3150 g zentrifugiert. Nach Abschluss der darauffolgenden Proteingehaltsbestimmung (siehe 2.2.4.2) wurden 100 µl Probenpuffer II hinzugegeben. Das darin enthaltene Glycerin beschwert die Proben und ermöglicht somit beim späteren Beladen der SDS-Gelelektrophorese (siehe 2.2.4.3) das Absinken der Proben in die mit Laufpuffer gefüllten Geltaschen.

### 2.2.4.2 Bestimmung des Proteingehaltes

Vor Durchführung der eigentlichen Gelelektrophorese wurde der Proteingehalt der Proben bestimmt. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte mit Hilfe des *Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kits*. Hierfür werden die Absorptionen der Proben mit denen der Verdünnungsreihe eines Standardproteins verglichen. Entsprechend der Herstellerangaben wurde aus 50 mg BSA eine Standardverdünnungsreihe erstellt. Es wurden jeweils 5 µl einer jeden Standardverdünnung und je 5 µl der zu untersuchenden Proben mit 45 µl Probenpuffer I gemischt, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Darauf erfolgte eine 1:50 Verdünnung mit 0,9% NaCl-Lösung. Das weitere Vorgehen ist den Angaben des *Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kits* zu entnehmen. Die Absorptionsmessung erfolgte mit einem Plattenspektralphotometer. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte in Triplikaten mittels der *FluoStar Optima Software*.

### 2.2.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Während der SDS-Gelelektrophorese durchlaufen Proteine ein elektrisches Feld. Hierfür wurden die Proteine zuvor mit dem stark negativ geladenen Detergens SDS behandelt. Als amphoterer Tensid reagiert SDS sowohl mit hydrophoben als auch mit ionischen Proteinbezirken und erreicht eine Entfaltung des Moleküls. Da schwere Proteine im elektrischen Feld langsamer wandern als leichte, ist es mit Hilfe eines

Molekulargewichtsstandards möglich, das Molekulargewicht der untersuchten Proteine zu beurteilen.

In dieser Arbeit wurde ein 6%iges Trenngel verwendet, das sich wie folgt zusammensetzt:

<b>Aqua dest.</b>	2,37 ml
<b>Trenngelpuffer</b>	1,076 ml
<b>Acrylamidlösung</b>	880 µl
<b>Ammoniumperoxidsulfat-Lösung</b>	7,7 µl
<b>TEMED</b>	3 µl

**Tab. 5:** Rezept für ein 6%iges Trenngel

Es wurden 3,75 ml dieses Trenngels in eine Kammer eingebracht und anschließend mit Aqua dest. überschichtet. In den folgenden 3 Stunden erfolgte das Polymerisieren des Gels bei RT. Im Anschluss wurde ein SDS-Sammelgel (Tab. 6) aufpipettiert und ein Kamm eingesetzt, um Probenaschen zu bilden.

<b>Aqua dest.</b>	1,35 ml
<b>Sammelgelpuffer</b>	790 µl
<b>Acrylamidlösung</b>	326 µl
<b>Ammoniumperoxidsulfat-Lösung</b>	5,6 µl
<b>TEMED</b>	2,25 µl

**Tab. 6:** Rezept für ein SDS-Sammelgel

Im Anschluss wurde das Gel für 24 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank belassen. Danach wurde der Kamm entfernt. Die Taschen wurden dreimal mit Laufpuffer gespült und wieder freigesaugt. Die Elektrophoreseapparatur wurde zusammengebaut und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Es wurden jeweils 10 µl aufbereiteter Proben (siehe 2.2.4.1), entsprechend einem Proteingehalt von 40 µg, aus Kontrolltieren, sowie isogenen und allogenen Nierentransplantaten in die mit Laufpuffer gefüllten Geltaschen pipettiert. In eine Geltasche wurde ein farbiger Molekulargewichtsstandard zur Molekulargewichtsbestimmung pipettiert. Bei 80 V für 10 Minuten durchliefen die Proben das Sammelgel. Die Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgte während weiterer 70 Minuten bei 120 V.

#### 2.2.4.4 Blotting

Als Blotting bezeichnet man ein Verfahren zum Transfer der aufgetrennten Proteine vom SDS-Gel auf eine Membran. In dieser Arbeit wurden PVD-Membranen verwendet. Nach dem Abschluss der Gelelektrophorese wurde das Gel 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert, während die Membran zunächst für eine Minute in Methanol und im Anschluss für 12 Minuten ebenfalls in Transferpuffer gelegt wurde. Darauf erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Blottingmembran für 3 Stunden bei 90 mA. Danach wurde die Membran für 60 Minuten an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurde die Membran eine Minute in Methanol gelegt und dann 10 Minuten in PBS gewaschen. Darauf erfolgte für 1 Stunde eine Blockierung auf der elektrischen Wippe mit 14 ml PBS/5% BSA, um freie Proteinbindungsstellen der Membran abzusättigen und somit unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Nachdem die Blockierung beendet war, erfolgte die Inkubation des gegen Nestin gerichteten Primärantikörpers in einer Verdünnung von 1:1000 mit PBS/5% BSA bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss wurde die Membran einmal kurz mit PBS/0,1% Tween abgespült und weitere viermal für 7 Minuten in PBS/0,1% Tween gewaschen. Darauf erfolgte für 90 Minuten bei RT die Inkubation eines Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers aus dem Kaninchen, welcher 1:5000 mit PBS/0,1% Tween und 2,5% Magermilchpulver verdünnt wurde. Danach wurde erneut dreimal für 10 Minuten mit PBS/0,1% Tween und einmal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Ein zweiter Nachweis mit Primärantikörpern gegen das konstitutiv exprimierte Protein Lamin A/C erfolgte unter gleichen Bedingungen. Abschließend erfolgte der Nachweis der gebundenen Peroxidase mit dem *lumi-light western-blotting-substrate*.

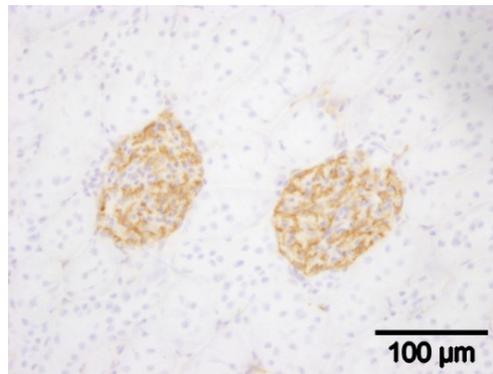
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Immunhistologie

#### 3.1.1 Einzelfärbungen

##### 3.1.1.1 Unbehandelte Nieren

Übereinstimmend mit zuvor veröffentlichten Studien [22] war die Nestinimmunreaktivität in Nieren unbehandelter Ratten des Stammes Lewis (n=4) auf Podozyten und einige wenige interstitielle Zellen beschränkt (Abb. 3). Kontrollschnitte, auf die kein Primärantikörper aufgetragen wurde, zeigten keine Färbung mit Antikörpern gegen Nestin.

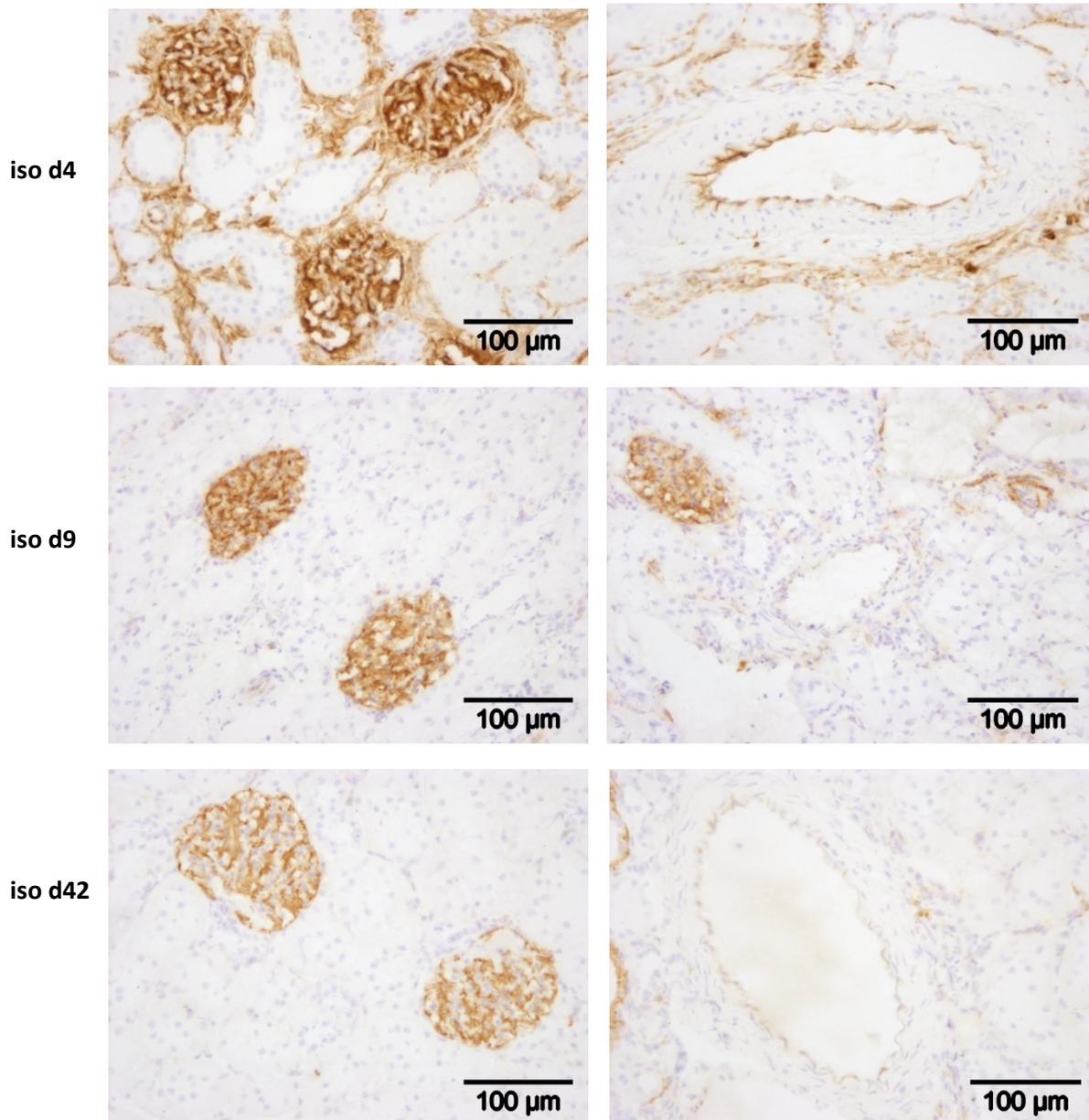


**Abb. 3:** Immunhistologische Färbung einer Lewis-Kontrollniere.

Gezeigt ist die immunhistologische Färbung einer Lewis-Kontrollniere mit Antikörpern gegen Nestin. Für die Färbung wurde ein Gefrierschnittpräparat von 7 µm Dicke verwendet. Der Nestinnachweis erfolgte mit einem Peroxidase-gekoppelten Nachweissystem in braun. Im Anschluss erfolgte eine Kerngegenfärbung mit Hämalaun.

##### 3.1.1.2 Isogene Transplantate

Zur Kontrolle operativ bedingter Organschädigungen wurden isogene Transplantate 4, 9 und 42 Tage post transplantationem untersucht (je n=4). Wie für unbehandelte Kontrollnieren beschrieben, ließ sich auch im isogenen Transplantat eine deutliche podozytäre Färbung beobachten. Zusätzlich zeigte sich 4 Tage nach Transplantation eine massive Nestinimmunreaktivität der arteriellen Intima, so wie vornehmlich interstitieller Zellen. Die podozytäre Färbung erschien kräftiger als in Kontrollnieren. Bis zum 9. postoperativen Tag nahm die Färbung deutlich ab und kehrte nahezu auf das Kontrollniveau zurück. Es konnte kein immunhistologischer Nachweis für Nestinexpression der arteriellen Intima mehr erbracht werden und die interstitielle Färbung lag nur minimal über dem Kontrollniveau. Bis zum 42. postoperativen Tag hatten isogene Transplantate wieder das Kontrollniveau erreicht. Abb. 4 zeigt die immunhistologische Färbung isogener Nierentransplantate mit anti-Nestin-Antikörpern im zeitlichen Verlauf.

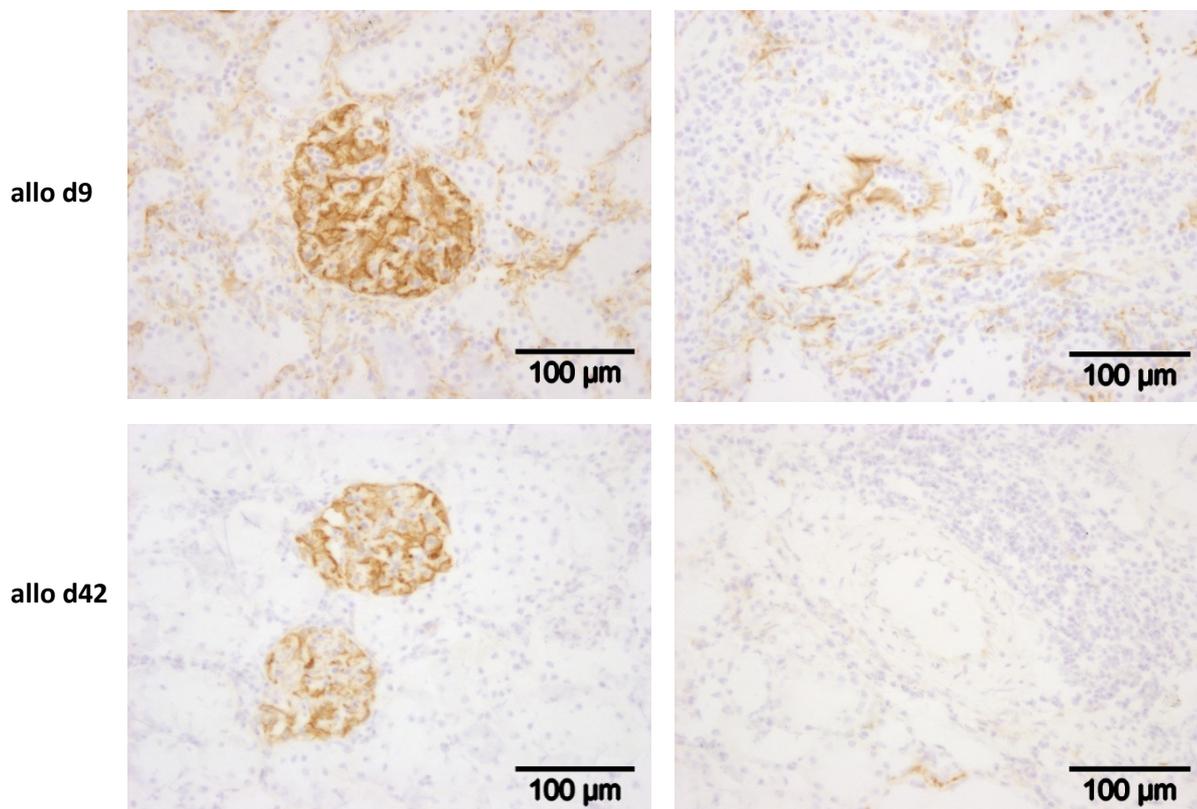


**Abb. 4:** Immunhistologische Färbungen isogener (iso) Nierentransplantate im zeitlichen Verlauf.

Gezeigt sind immunhistologische Färbungen isogener (iso) Nierentransplantate mit Antikörpern gegen Nestin. Isogene Transplante wurden 4, 9 und 42 Tage (iso d4, iso d9, iso d42) post transplantationem immunhistologisch auf Nestinimmunreaktivität hin untersucht. Für die Färbungen wurden Gefrierschnittpräparate von 7 µm Dicke verwendet. Der Nestinnachweis erfolgte mit einem Peroxidasegekoppelten Nachweissystem in braun. Im Anschluss erfolgte eine leichte Kerngegenfärbung mit Hämalaun.

### 3.1.1.3 Allogene Transplantate

Allogene Transplantate wurden am 9. und am 42. postoperativen Tag immunhistologisch auf Nestinimmunreaktivität hin untersucht (je n=4). Auch im allogenen Transplantat konnte eine deutliche podozytäre Nestinimmunreaktivität beobachtet werden. 9 Tage post transplantationem war eine massive Nestinimmunreaktivität der arteriellen Intima, so wie vornehmlich interstitieller Zellen mit Nestin-Antikörpern zu beobachten, die bis zum 42. postoperativen Tag wieder auf das Kontrollniveau zurückkehrte. Abb. 5 zeigt immunhistologische Färbungen allogener Nierentransplantate am 9. und am 42. postoperativen Tag.

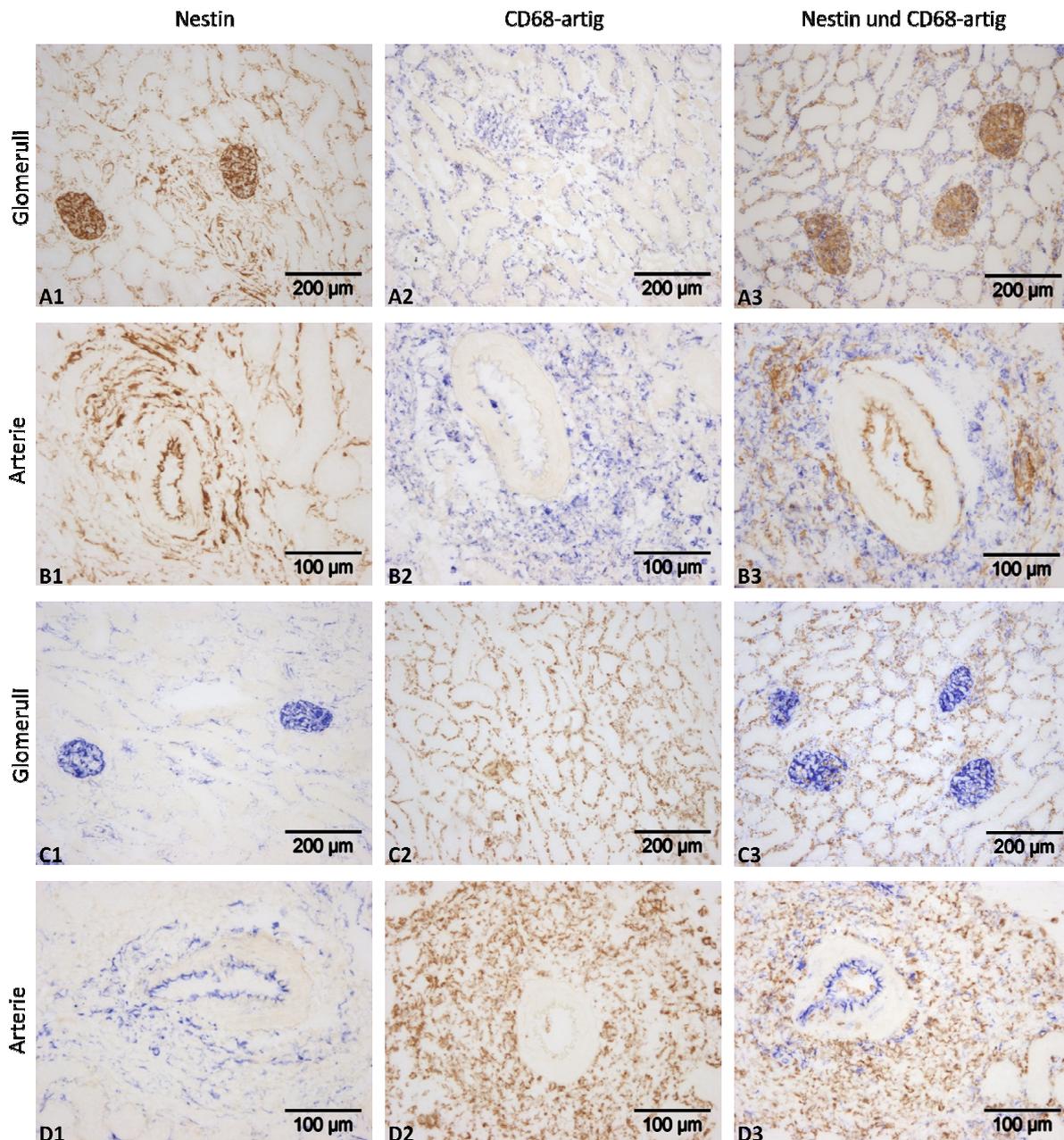


**Abb. 5:** Immunhistologische Färbungen allogener (allo) Nierentransplantate im zeitlichen Verlauf.

Gezeigt sind immunhistologische Färbungen allogener (allo) Nierentransplantate mit Antikörpern gegen Nestin. Allogene Transplante wurden 9 und 42 Tage (allo d9, allo d42) post transplantationem immunhistologisch auf Nestinimmunreaktivität hin untersucht. Für die Färbungen wurden Gefrierschnittpräparate von 7 µm Dicke verwendet. Der Nestinnachweis erfolgte mit einem Peroxidasegekoppelten Nachweissystem in braun. Im Anschluss erfolgte eine leichte Kerngegenfärbung mit Hämalaun.

### 3.1.2 Doppelfärbungen

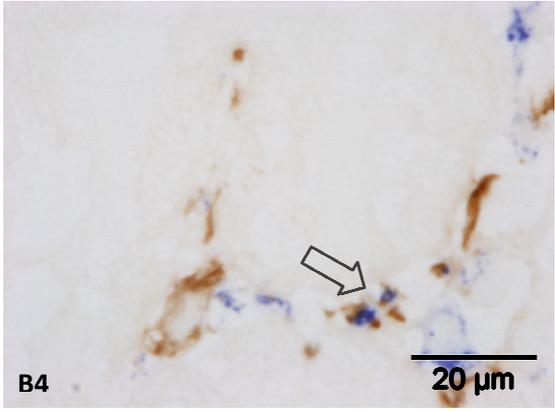
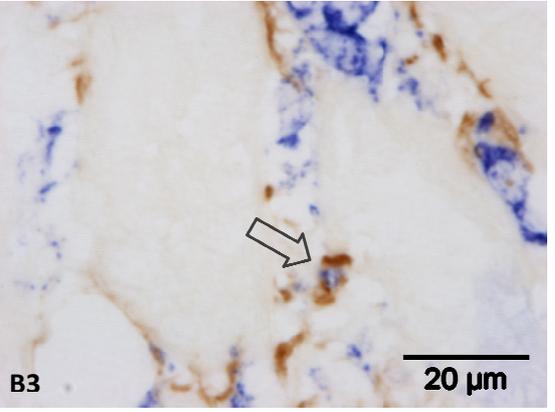
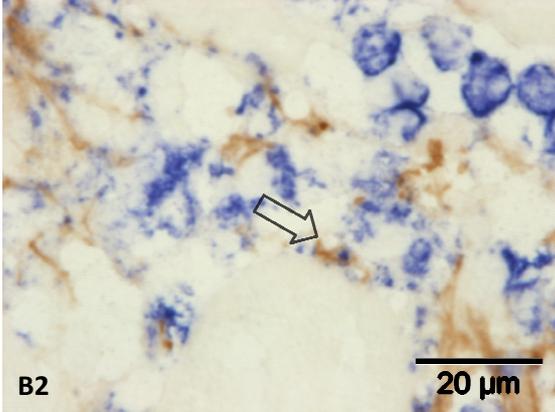
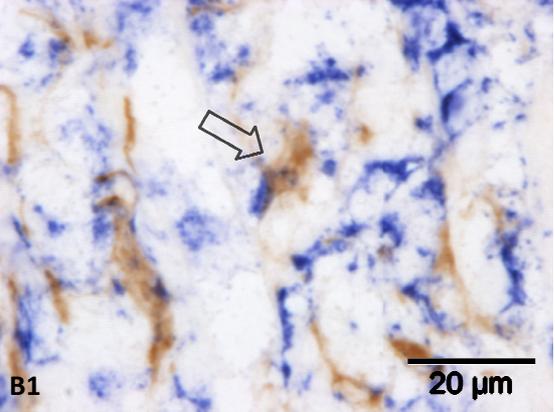
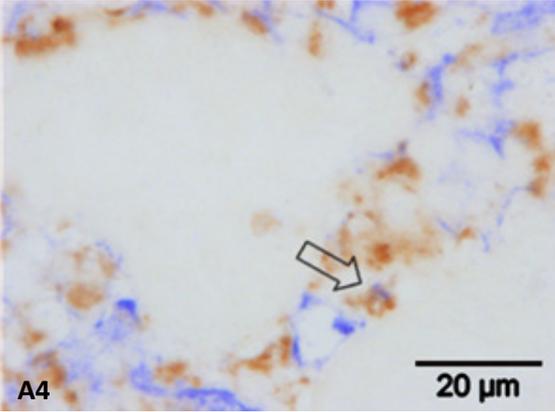
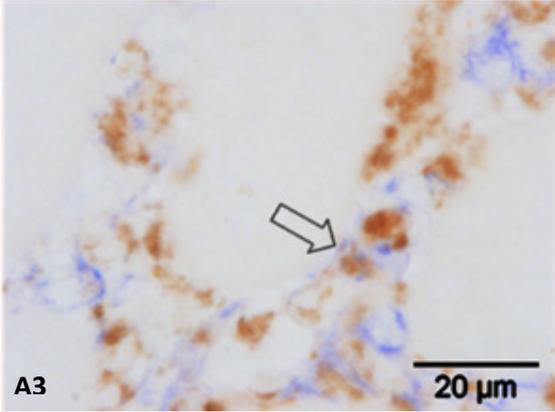
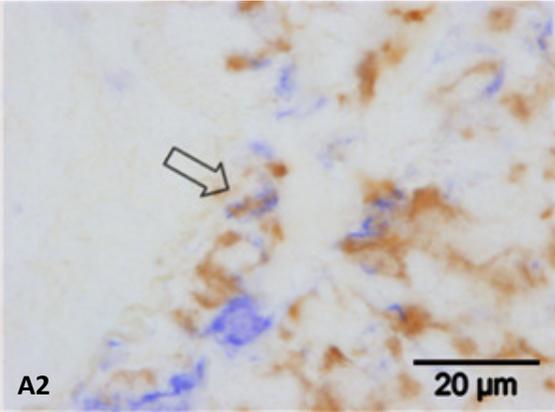
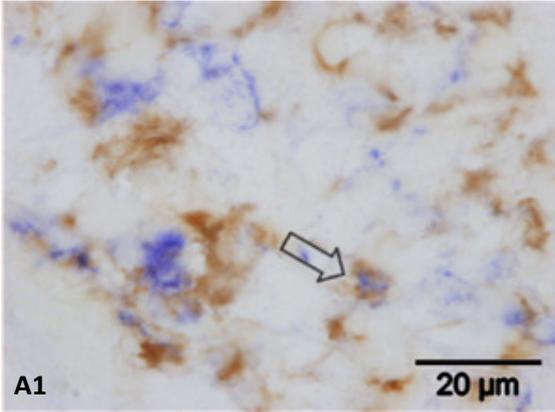
Um zu prüfen, ob Nestin durch Monozyten/Makrophagen exprimiert werden kann, wurden Doppelfärbungen mit dem monoklonalen Antikörper ED1 durchgeführt. ED1 erkennt ein CD68-artiges lysosomales Antigen, das von den meisten Monozyten und Makrophagen exprimiert wird [30]. Hierfür wurden allogene Transplantate des 9. postoperativen Tages untersucht (Abb. 6). Es waren einige wenige Zellen nachweisbar, die sowohl Antikörper gegen Nestin als auch den ED1 Antikörper banden (Abb. 7). Diese Zellen fanden sich an unterschiedlichen Stellen des Transplantates. Des Weiteren fällt eine besondere räumliche Nähe zahlreicher für CD68-artig anfärbbarer Zellen zu nestinpositiven Zellen auf.



**Abb. 6:** Doppelfärbungen allogener Nierentransplantate am 9. postoperativen Tag.

Gezeigt sind Doppelfärbungen allogener Nierentransplantate 9 Tage nach Transplantation. Der Nestinnachweis erfolgte in den Abbildungsreihen A und B mit einem Peroxidase-gekoppelten Nachweissystem in braun, während der Nachweis des monozyten-/makrophagenspezifischen CD68-artigen Antigens mit Hilfe eines alkalische Phosphatase (AP)-gekoppelten Nachweissystems in blau erfolgte. Für die Färbungen der Abbildungsreihen C und D wurden die Nachweismethoden der beiden Antigene invertiert (Nestin in blau, CD68-artig in braun). Für alle Färbungen wurden Gefrierschnittpräparate von 5 µm Dicke verwendet.

Wie auch in den Nieren unbehandelter Kontrolltiere ist eine deutlich Nestinimmunreaktivität in Podozyten (A1 und C1) nachweisbar. 9 Tage nach allogener Transplantation kann zusätzlich Nestinimmunreaktivität zahlreicher interstitieller Zellen und der arteriellen Intima nachgewiesen werden (A1-D1). Des Weiteren sind massive perivasale (B2 und D2) und interstitielle Infiltrate monozytärer Zellen (A2 und C2) zu beobachten.

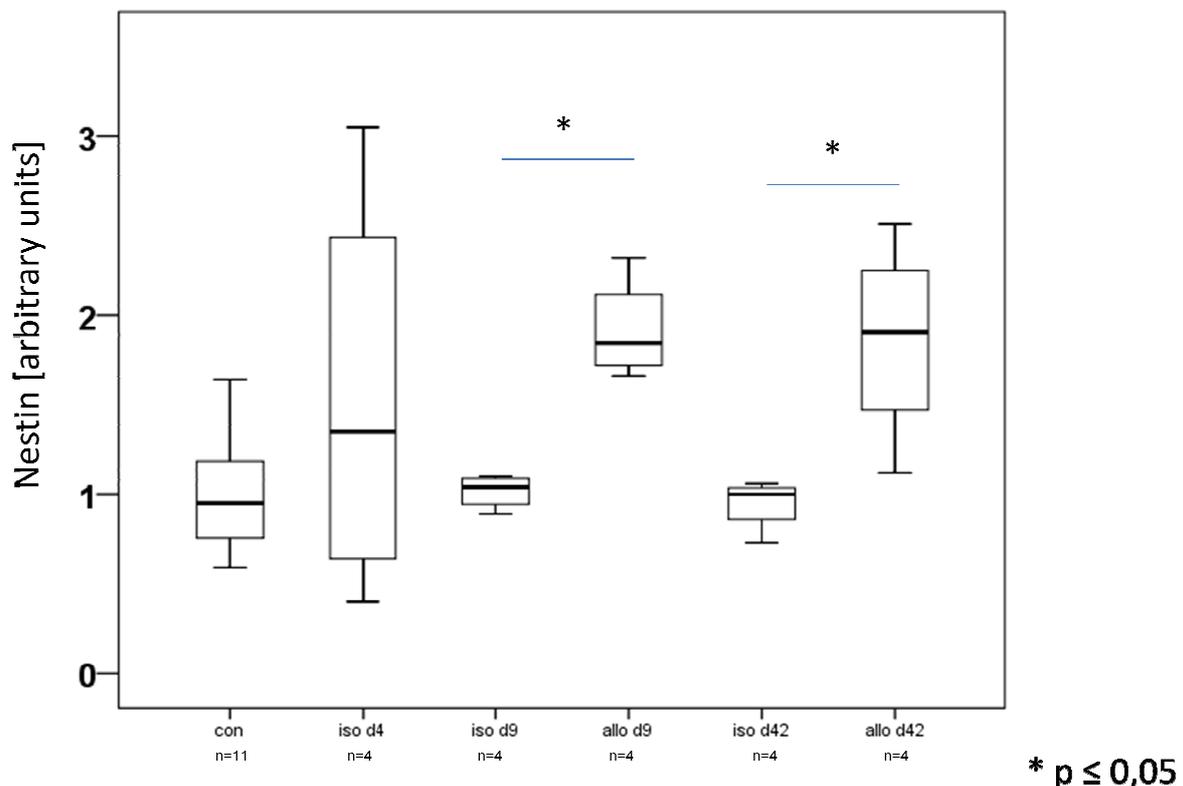


**Abb. 7:** Doppelt immunreaktive Zellen in allogenen Nierentransplantaten am 9. postoperativen Tag.

Gezeigt sind ausgewählte Zellen, die sowohl mit Antikörpern gegen Nestin, als auch gegen das CD68-artige Antigen reagieren. Es wurden Gefrierschnittpräparate von 5 µm Dicke verwendet. In den Bildern A1-A4 erfolgte der Nestinnachweis mittels eines alkalische Phosphatase (AP)-Nachweises in blau. Der Nachweis des CD68-artigen-Antigens erfolgte mittels eines Peroxidase-gekoppelten Nachweissystems in braun. Für die immunhistologischen Färbungen der Bilder B1-B4 wurden die Nachweismethoden invertiert (Nestin in braun, CD68-artig in blau).

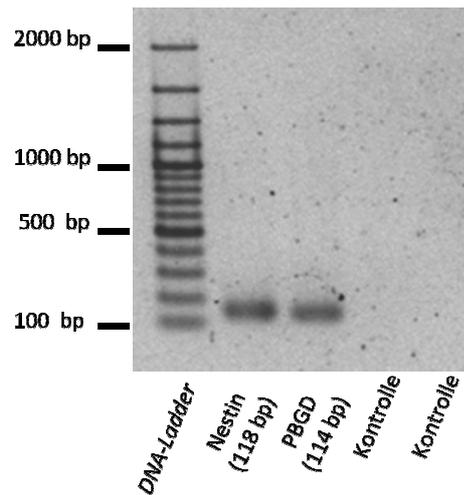
### 3.2 Nachweis nestincodierender mRNA mittels quantitativer real-time RT-PCR

Mittels quantitativer real-time RT-PCR konnte die Expression nestincodierender mRNA sowohl in Kontrollnieren als auch in isogenen und allogenen Transplantaten nachgewiesen werden (Abb. 8). Es ergab sich jeweils die erwartete Produktlänge von 118 Basenpaaren (bp) (Abb. 9). Die Sequenzierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte bestätigte den Nachweis nestincodierender cDNA.



**Abb. 8:** Ergebnisse der quantitativen real-time RT-PCR zum Nachweis nestincodierender mRNA.

Am 4. Tag nach isogener (iso d4) Transplantation variiert die Expression nestincodierender mRNA in Abhängigkeit vom untersuchten Transplantat. Die Expression hat nach 9 Tagen (iso d9) wieder das Kontrollniveau (con) erreicht und verharrt dort für mindestens 6 Wochen (iso d42). Sowohl 9 als auch 42 Tage post transplantationem ist die Nestin mRNA-Expression in allogenen (allo) Transplantaten gegenüber isogenen (iso) Transplantaten signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 9:** Exemplarische Darstellung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Produkte der quantitativen real-time RT-PCR.

Gezeigt sind gelelektrophoretisch aufgetrennte Produkte der quantitativen real-time RT-PCR, sowie ein zu deren Längenbestimmung in Basenpaaren (bp) mitgeführter DNA-Größenstandard (*DNA-Ladder*). Die Auftrennung erfolgte in einem 1%igen Agarosegel, welches in einer 1%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt wurde. Die Banden wurden mit Hilfe von UV-Licht (322 nm) sichtbar gemacht. Die Nestin mRNA-Expression wurde durch Vergleich mit dem konstitutiv exprimierten Enzym Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) quantifiziert. Als Negativkontrollen wurden die Produkte von RT-PCR Ansätzen verwendet, denen keine cDNA hinzugefügt wurde, so dass es zu keiner Produktamplifikation kommen konnte.

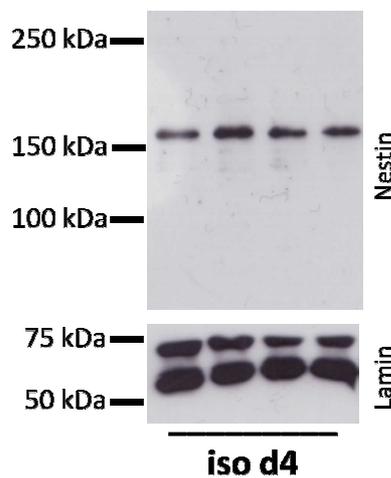
### 3.3 Westernblot

#### 3.3.1 Unbehandelte Nieren

Mit Gewebe unbehandelter Kontrollnieren konnte mittels Westernblot kein Nachweis für Nestinexpression erbracht werden.

#### 3.3.2 Isogene Transplantate

Isogene Transplantate wurden am 4., 9. und 42. postoperativen Tag mittels Westernblot untersucht (je n=4). Hierbei konnte 4 Tage nach Transplantation ein Antigennachweis für Nestin mit einem Molekulargewicht von ca. 160 kDa erbracht werden (Abb. 10). Sowohl am 9. als auch am 42. postoperativen Tag nach isogener Transplantation waren keine Banden mehr detektierbar (Abb. 11), was dem Kontrollniveau entspricht.

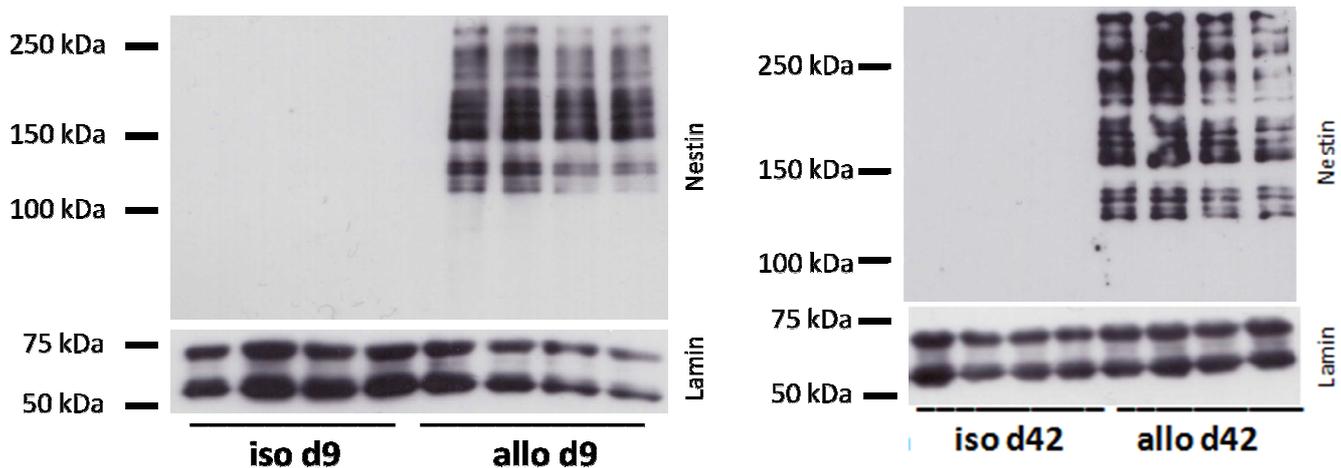


**Abb. 10:** Nestinimmunreaktivität im Westernblot am 4. postoperativen Tag im isogenen (iso d4) Nierentransplantat.

Gezeigt ist ein Röntgenfilm auf dem mittels Chemilumineszenz für jeweils 4 isogene Nierentransplantate des 4. postoperativen Tages (iso d4) unter Verwendung von Nestinantikörpern eine Bande bei 160 *kilodalton* (kDa) detektiert werden konnte. Zum Nachweis einer einheitlichen Beladung der Probenaschen erfolgte in einem zweiten Schritt der Nachweis von Lamin A/C.

### 3.3.3 Allogene Transplantate

Allogene Transplantate wurden 9 und 42 Tage post transplantationem mittels Westernblot auf Nestinimmunreaktivität hin untersucht (je n=4). Sowohl 9 als auch 42 Tage nach allogener Transplantation konnte ein deutlicher Bandennachweis für Nestin und dessen Fragmente mit einem Molekulargewichtsbereich von 110 – 270 kDa erbracht werden (Abb. 11).



**Abb. 11:** Nestinimmunreaktivität im Westernblot. Nestinimmunreaktivität 9 (d9) und 42 (d42) Tage nach isogener (iso) und allogener (allo) Transplantation.

Gezeigt sind Röntgenfilme auf denen mittels Chemilumineszenz für jeweils 4 Proben isogener (iso) und allogener (allo) Transplantate vom 9. (d9) und 42. (d42) postoperativen Tag nestinimmunreaktive Banden detektiert wurden.

Am 9. postoperativen Tag konnte in isogenen Transplantaten mittels Westernblot kein Antigennachweis für Nestin erbracht werden, was dem Kontrollniveau entspricht. 9 Tage nach allogener Transplantation sind eine Vielzahl nestinimmunreaktiver Banden detektierbar, deren Molekulargewicht sich zwischen 110 *kilodalton* (kDa) und 260 kDa bewegt, mit auffallend kräftigen Banden bei ca. 130 kDa und 160 kDa. Auch am 42. postoperativen Tag konnte in isogenen Transplantaten mittels Westernblot kein Antigennachweis für Nestin erbacht werden. 42 Tage nach allogener Transplantation konnten nestinimmunreaktive Banden in einem Bereich von 130-270 kDa detektiert werden. Die stärkste Immunreaktivität zeigte sich hierbei bei 160 kDa, 240 kDa und 260 kDa. Zum Nachweis einer angemessenen Beladung der Probenaschen erfolgte in einem zweiten Schritt der Nachweis von Laminin A/C.

## 4. Diskussion

Die CAN ist derzeit die häufigste Ursache für den Verlust humaner Nierentransplantate [106]. Die Assoziation von Nestinexpression und zwei wichtigen Merkmalen der CAN, interstitieller Fibrose und chronischem Gefäßumbau, in anderen Erkrankungen [2, 19, 96, 100, 114, 123] veranlasste uns, Nierentransplantate auf ihre Nestinexpression hin zu untersuchen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass isogene Transplantation, die zu Ischämie-/Reperfusionsschaden führt, zu einer transienten Nestinexpression interstitieller Zellen und der arteriellen Intima führt, welche spätestens ab dem 4. Tag nachweisbar ist und bis zum 9. postoperativen Tag auf das Kontrollniveau zurückkehrt. Hingegen ist nach allogener Transplantation eine vermehrte Nestinexpression von Endothel- und interstitiellen Zellen noch bis zu 6 Wochen nachweisbar.

In dieser Arbeit konnte die anfängliche Hypothese bestätigt werden, dass der Nestinproteingehalt der Niere nach allogener Nierentransplantation gegenüber isogener Transplantation signifikant erhöht ist. Des Weiteren legen die Daten nahe, dass die Expression des Intermediärfilamentproteins und Progenitorzellmarkers Nestin durch die zwei wesentlichen Risikofaktoren der CAN, Ischämie-/Reperfusionsschaden und akute Abstoßung, induziert wird.

Im Folgenden sollen die erzielten Ergebnisse kritisch beleuchtet und diskutiert werden.

### 4.1 Vor- und Nachteile des Tiermodells

Das in dieser Arbeit verwendete Tiermodell der CAN F344→Lewis gilt als sehr gut untersucht und kommt der CAN des Menschen sehr nahe [77]. Die Möglichkeit sowohl isogene als auch allogene Transplantationen durchzuführen, erlaubt es perioperativen von alloantigenabhängigem Transplantatschaden abzugrenzen und auch im zeitlichen Verlauf zu untersuchen, was mit humanem Material in dieser Form nicht möglich wäre. Des Weiteren ermöglicht die Verwendung gesunder Laborratten die Untersuchung von Nieren, die weitgehend unbeeinflusst von nierenschädigenden Faktoren, wie bspw. arterieller Hypertonie, Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen oder pharmakologischen Substanzen sind.

Dennoch bleibt die Übertragbarkeit auf humane pathologische Vorgänge schon aufgrund der unterschiedlichen Spezies eingeschränkt und kann allenfalls wegweisend sein. Der Verzicht auf eine immunsuppressive Therapie entspricht zwar nicht der klinischen Realität, er schließt jedoch die meist nephrotoxische Immunsuppression als Ursache pathologischer Veränderungen im Nierentransplantat aus. Des Weiteren gibt

es Hinweise darauf, dass nephrotoxische Immunsuppressiva die Nestinexpression induzieren können [2].

## **4.2 Nestinexpression in untransplantierten Kontrollnieren**

Übereinstimmend mit vorherigen Ergebnissen unterschiedlicher Arbeiten [11, 22, 100, 114, 146] konnten wir mittels Immunhistologie in untransplantierten Kontrollnieren eine regelhafte Nestinexpression im Bereich der Glomeruli und sehr weniger interstitieller Zellen nachweisen. Aufgrund von Morphologie und charakteristischer Lokalisation der glomerulären Zellen, sowie der breiten Akzeptanz von Nestin als Podozytenmarker [22, 123, 136] ordnen wir diese Zellen ebenfalls als Podozyten ein.

Da Vergleiche mit aktueller Literatur zeigten, dass in anderen Arbeiten ein ähnliches Expressionsmuster in gesunden Rattennieren nachgewiesen wurde [11, 22], gehen wir davon aus, dass der von uns verwendete monoklonale Nestinantikörper das Antigen spezifisch erkennt. Allerdings kann in jeder immunhistologischen Untersuchung eine unspezifische Bindung anderer Antigene nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Nestinexpression spiegelte sich in der quantitativen RT-PCR durch den Nachweis geringer Mengen von Nestin-mRNA wider, während im Westernblot kein Nachweis erbracht werden konnte. Letzteres ist höchstwahrscheinlich auf die geringere Sensitivität des Westernblots gegenüber der PCR zurückzuführen. Sakairi et al. [100] konnten eine Nestinexpression in gesunden Rattennieren im Westernblot ebenfalls nicht nachweisen. Zou et al. [146] untersuchten unbehandelte Rattennieren ebenfalls mittels Westernblot und konnten einen Nestinnachweis lediglich in Material erzielen, das aufgereinigte Glomeruli enthielt, während wir das gesamte Nierenparenchym untersuchten. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass die glomeruläre Nestinexpression unterhalb der Nachweiskante blieb, da die nestinpositiven Glomeruli nur einen Bruchteil des ansonsten weitgehend nestinnegativen Nierengewebes ausmachen.

## **4.3 Nestinexpression nach isogener Nierentransplantation**

Die isogene Nierentransplantation innerhalb des Inzuchtrattenstammes Lewis kommt einer Transplantation unter eineiigen Zwillingen aufgrund der hohen genetischen Übereinstimmung von Spender und Empfänger sehr nahe und ermöglicht somit, den durch die Operation bedingten Schaden zu untersuchen und von alloantigenabhängigen Schäden im allogenen Modell abzugrenzen.

Isogene Transplantate wurden 4, 9 und 42 Tage post transplantationem untersucht. Die Nestinexpression war am 4. postoperativen Tag stark ausgeprägt und spiegelte sich immunhistologisch in einer massiven Immunreaktivität der arteriellen Intima, zahlreicher interstitieller Zellen und einer augenscheinlich stärkeren podozytären Immunreaktivität wider.

Eine verstärkte podozytäre Nestinexpression wurde bereits zuvor im Rattenmodell der induzierten Puromycin-Aminonukleosid (PAN)-Nephrose beschrieben [146]. Eine ähnlich variierende Expression von podozytären Intermediärfilamenten, insbesondere von Desmin, wurde zuvor für unterschiedlichste Nephrosen, Nephritiden und Nephropathien beschrieben [52, 139, 146]. Untersuchungen der IgA-Nephropathie des Menschen zeigten hingegen eine reduzierte podozytäre Nestinexpression [114], was die eingeschränkte Übertragbarkeit tierexperimenteller Daten auf den Menschen unterstreicht.

Die Ergebnisse der Immunhistologie bestätigten sich im Westernblot. Bisher wurden in der Ratte drei unterschiedliche Nestinisoformen mit einem Molekulargewicht von 157 kDa, 199 kDa und 209 kDa nachgewiesen [34, 74]. Im Westernblot konnte 4 Tage nach isogener Transplantation eine einzelne immunreaktive Bande bei ca. 160 kDa nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich der 157 kDa Isoform entspricht.

In der quantitativen RT-PCR zeigten sich gegenüber Kontrollnieren erhöhte Werte von Nestin-mRNA. Die Expression von Nestin-mRNA 4 Tage nach isogener Transplantation weist eine große Streuung auf. Bereits am 9. postoperativen Tag wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wieder das Kontrollniveau erreicht und blieb bis 6 Wochen nach Transplantation bestehen. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass die Nestinexpression vor dem 4. postoperativen Tag, bzw. sogar unmittelbar nach Transplantation, ihr Maximum erreicht. Dies würde die Streuung der mRNA-Expression erklären und mit der Beobachtung transienter Nestinexpression kurz nach unterschiedlichsten Gewebeschäden korrelieren [19, 28, 29].

## **4.4 Nestinexpression nach allogener Nierentransplantation**

### **4.4.1 Akute Abstoßungsepisode: 9. postoperativer Tag**

Allogene F344→Lewis Transplantate erfahren eine selbstlimitierende akute Abstoßungsepisode [135], die ungefähr am 9. postoperativen Tag ihren Höhepunkt erreicht und eine heftige immunologische Reaktion des Transplantatempfängers darstellt. Da akute Abstoßungsepisoden als wichtigster Risikofaktor der CAN [3, 58] gelten, ist es von Interesse, Transplantate zu diesem Zeitpunkt zu untersuchen.

In der Immunhistologie zeigte sich eine massive Färbung zahlreicher interstitieller Zellen sowie der arteriellen Intima. Im Westernblot konnten zahlreiche Banden mit

einem Molekulargewicht von 110 – 260 kDa nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Immunhistologie und des Westernblots wurden in der quantitativen RT-PCR durch signifikant erhöhte Nestin-mRNA Werte gegenüber isogener Transplantate des 9. postoperativen Tages bestätigt.

Die Ergebnisse des Westernblots bedürfen weiterer Erläuterung. Es konnten mehrere Banden mit unterschiedlichem Molekulargewicht nachgewiesen werden. Entsprechend der Westernblotergebnisse des 4. postoperativen Tages nach isogener Transplantation konnte das stärkste Signal bei ca. 160 kDa beobachtet werden, welches wahrscheinlich der bereits beschriebenen 157 kDa Isoform entspricht [34, 74]. Der Nachweis multipler nestinimmunreaktiver Banden wurde bereits zuvor von unterschiedlichen Autoren beschrieben [11, 39, 99, 119]. Als Ursprung der zahlreichen Banden sind verschiedene Möglichkeiten denkbar, die sich gegenseitig nicht ausschließen.

1. Banden niedrigeren Molekulargewichts entsprechen Nestinfragmenten. Die akute Abstoßungsepisode stellt eine heftige immunologische Reaktion dar, die mit vermehrtem nekrotischem und apoptotischen Zelluntergang einhergeht. Dabei können unterschiedlich große Fragmente des Zytoskeletts entstehen [87].
2. Einige Banden repräsentieren eine unterschiedlich starke Glykosylierung und/oder Phosphorylierung, die bereits beschrieben wurden [39, 99].
3. Es wurde bereits gezeigt, dass Nestin zur Polymerisierung auf andere Intermediärfilamente, insbesondere Vimentin und Desmin [78, 113], angewiesen ist. Diese beiden Intermediärfilamente weisen ein Molekulargewicht von 50-60 kDa auf [146] und könnten als nestinhaltige Fragmente unterschiedlichster Größe vorliegen. Hierfür wäre jedoch eine kovalente Bindung beider Filamente nötig. Es existieren experimentelle Hinweise darauf, dass sog. Transglutaminasen in der Lage sind Proteine kovalent miteinander zu verbinden [23]. Für Nestin sind durch Transglutaminasen katalysierte kovalente Proteinbindungen jedoch bisher nicht untersucht worden.
4. Neben der Polymerisierung mit anderen Intermediärfilamenten ist Nestin aufgrund eines ungewöhnlich langen C-Terminus in der Lage, mit Mikrofilamenten und Mikrotubuli zu interagieren [74]. Mikrotubuli sind die größten Bestandteile des Zytoskeletts, die u.a. in der Lage sind mit sog. Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAP) zu interagieren [76].

Es ist prinzipiell denkbar, dass nestinhaltige Mikrotubulibestandteile durch den verwendeten Antikörper erkannt und nachgewiesen wurden. Auch hierfür wäre jedoch eine kovalente Bindung beider Proteine notwendig.

5. Es ist nicht auszuschließen, dass unspezifische Bindungen erfolgt sind und einige Banden nicht nestinhaltigen Filamenten entsprechen.

Aufgrund der klaren Differenzierung des Bandenmusters und der Verwendung des gleichen monoklonalen Antikörpers für die immunhistologischen Untersuchungen, sowie der Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden mit der RT-PCR erscheint eine unspezifische Bindung eher unwahrscheinlich, kann jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### **4.4.2 Phase des chronischen Gefäßumbaus: 42. postoperativer Tag**

Am 42. Tag nach allogener Transplantation befinden sich die Transplantate in der Phase des chronischen Gefäßumbaus. Vergleichbar mit Transplantaten des 9. postoperativen Tages zeigten sich im Westernblot ebenfalls multiple nestinimmunreaktive Banden. Die stärkste Immunreaktivität zeigte sich hierbei erneut bei ca. 160 kDa, sowie zusätzlich bei 240 kDa und 260 kDa. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass das Molekulargewicht glykosilierten Nestins 240 kDa beträgt [39]. Prinzipielle Ursachen für den Nachweis multipler Banden wurden bereits unter 4.4.1 diskutiert. Im Vergleich zu allogenen Tag 9 Transplantaten zeigt sich im Westernblot eine etwas stärkere Immunreaktivität in Bereichen höherer Molekulargewichte. Über die Ursache hierfür kann nur gemutmaßt werden. Denkbar wäre eine funktionell andere Einbindung von Nestin in das Zytoskelett mit entsprechend unterschiedlicher Modifikation. So konnten Sahlgren et al. [99] bereits zeigen, dass Nestin einer zellzyklusabhängigen Phosphorylierung unterliegt und Daniel et al. konnten zeigen, dass Nestin in Vorgänge der Zellteilung eingebunden ist [27]. Es ist vorstellbar, dass nestinexprimierende Zellen während der akuten Abstoßungsepisode eine andere Proliferationsrate aufweisen als entsprechende Zellen während der Phase des chronischen Gefäßumbaus und Nestin entsprechend unterschiedlich in das Zytoskelett eingebunden ist. Diese Vermutung lässt sich anhand der erzielten Daten jedoch in keinsten Weise untermauern und bedarf weiterer Untersuchung.

Die Ergebnisse des Westernblots bestätigen sich in der quantitativen RT-PCR mit signifikant erhöhten Nestin-mRNA Werten gegenüber isogenen Tag 42 Transplantaten. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen jedoch kaum eine extraglomeruläre Färbung mit Antikörpern gegen Nestin und entsprechen somit fast dem Kontrollniveau. Womöglich ist Nestin zum untersuchten Zeitpunkt auf andere Weise in das Zytoskelett

integriert, wodurch einige Epitope für immunhistologische Methoden nicht zugänglich sind. Denkbar wäre auch, dass die im Vergleich zu Kontrollnieren signifikant erhöhte Nestinexpression durch eine verstärkte Expression der Podozyten zustande kommt [146]. Augenscheinlich konnte jedoch keine verstärkte Anfärbbarkeit von Podozyten festgestellt werden. Es muss ebenfalls bedacht werden, dass der verwendete Antikörper das Antigen womöglich nicht ausreichend sensitiv bindet und somit falsch negative Ergebnisse in der Immunhistologie entstanden sind.

## **4.5 Herkunft und Funktion nestinpositiver Zellen**

In dieser Arbeit konnte 4 Tage nach isogener und 9 Tage nach allogener Transplantation eine extraglomeruläre Nestinexpression immunhistologisch nachgewiesen werden. Zu beiden Zeitpunkten wurde Nestin durch zahlreiche interstitielle Zellen und die arterielle Intima exprimiert. Ein vergleichbares Expressionsmuster wurde bisher weder für gesunde noch pathologische Rattennieren beschrieben.

### **4.5.1 Nestinimmunreaktive interstitielle Zellen**

Während der Organogenese wird Nestin nicht nur durch Podozyten, sondern auch von Tubulusepithelzellen und arteriellem Endothel exprimiert [11]. Tierexperimentelle Studien, die renale Nestinexpression unter definierten pathologischen Bedingungen untersuchen, lassen kein einheitliches Expressionsmuster erkennen: Sakairi et al. [100] untersuchten die Nestinexpression nach unilateraler Ureterobstruktion in der Ratte, einem etablierten Modell für renale Fibrose, und konnten 13 Tage nach unilateraler Ureterobstruktion eine massive Nestinreexpression vornehmlich im Tubulusepithel beobachten, sowie eine geringere Expression durch spindelförmige interstitielle Zellen. Tomioka et al. [123] untersuchten die Nestinexpression am Rattenmodell der IgA-Nephropathie und konnten eine Nestinexpression durch tubulointerstitielle Zellen nachweisen. Ahn et al. [2] konnten ebenfalls tubulointerstitielle nestinpositive Zellen während der Cyclosporin-A-Nephropathie der Ratte beobachten. Während der induzierten PAN-Nephrose [146] variierte die podozytäre Nestinexpression lediglich, ohne dass eine ektopische Nestinexpression nachgewiesen werden konnte. Trotz der unterschiedlichen Expressionsmuster konnte in jeder Studie, die eine Nestinexpression durch interstitielle Zellen beschreibt, eine positive Korrelation zwischen Nestinexpression und interstitieller Fibrose hergestellt werden [2, 100, 123]. Da in dieser Arbeit allogene Transplantate bis zu 6 Wochen post transplantationem erhöhte Nestinproteingehalte aufwiesen, ist es möglich, dass auch für die Pathogenese der CAN eine positive Korrelation zwischen Nestinexpression und interstitieller Fibrose

hergestellt werden kann. Dieser mögliche Zusammenhang sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Weiterhin stellt sich die Frage nach der Identität der nestinpositiven interstitiellen Zellen. Ihre Lokalisation und Morphologie lässt vermuten, dass es sich um Fibroblasten ähnliche Zellen handelt. Durch Doppelfärbungen mit  $\alpha$ -SMA konnten interstitielle nestinpositive Zellen bereits in anderen Krankheitsmodellen als Myofibroblasten identifiziert werden [100, 123]. Die Herkunft und Funktion nestinpositiver Myofibroblasten ist weitgehend unklar. Es sind unterschiedliche Ursprünge denkbar:

1. Die Zellen entstammen ortsständigen aktivierten Fibrozyten [123, 144].
2. Es handelt sich um Zellen endothelialen Ursprungs, die durch EndMT einen neuen Phänotyp angenommen haben [123, 144].
3. Es handelt sich um Zellen epithelialen Ursprungs, bspw. Tubulusepithelzellen, die durch *epithelial to mesenchymal transition* einen neuen Phänotyp angenommen haben [123, 143, 144].
4. Die Zellen entstammen dem Transplantatempfänger und sind von außen in das Gewebe eingewandert [123, 144]. Womöglich handelt es sich um zirkulierende Progenitorzellen des Spenders [5, 112], die das Parenchym direkt infiltrieren oder um EPC [5], die zunächst in das Transplantatendothel eingebaut wurden und dann durch EndMT zu mesenchymalen Zellen differenzieren.

Die von Sahlgren et al. [99] nachgewiesene zellzyklusabhängige posttranslationale Modifikation von Nestin und die durch Daniel et al. [27] nachgewiesene verminderte Proliferation von Mesangiumzellen bei supprimierter Nestinexpression lassen eine funktionelle Bedeutung für die Zellteilung vermuten. Es liegt somit nahe, dass die Nestinexpression von Myofibroblasten lediglich deren verstärkte Proliferation widerspiegelt. Da in bisherigen Untersuchungen jedoch nicht alle  $\alpha$ -SMA positiven Zellen auch Nestin exprimierten, ist es auch denkbar, dass Nestinexpression den Ursprung solcher Myofibroblasten widerspiegelt [123].

Es ist möglich, dass ortsständige, ruhende Fibrozyten Nestin exprimieren, wenn sie sich aufgrund eines pathologischen Stimulus zu beweglichen Fibroblasten differenzieren. Einige Studien weisen auf eine funktionelle Bedeutung von Nestin für Zellmotilität hin [123]. Kleeberger et al. [64] konnten bspw. zeigen, dass mittels *short hairpin* RNA (shRNA) reduzierte Nestinexpression signifikant die Zellmigration von Prostatatumorzellen *in vitro* senkt, die Zellproliferation selbst davon allerdings unberührt bleibt. Des Weiteren konnte eine 5-fach geringere Metastasierungstendenz nachgewiesen werden. Dennoch ist die Datenlage bisher nicht ausreichend, um stichhaltige Aussagen treffen zu können.

#### 4.5.2 Nestinimmunreaktive Zellen der arteriellen Intima

In der aktuellen Literatur ließ sich keine Studie auffinden, die eine wie von uns beobachtete endotheliale Nestinexpression vergleichbarer Intensität in der adulten Niere nachweisen konnte. Eine endotheliale Nestinexpression während der Angiogenese wurde jedoch mehrfach beschrieben und kann als regelhaft bezeichnet werden [82, 117]. Geht man davon aus, dass Nestinexpression Zellproliferation reflektiert, so lässt sich die endotheliale Nestinimmunreaktivität mit der wahrscheinlich vermehrten Expression angiogenetischer Faktoren, aufgrund des durch die Transplantation bedingten Ischämie-/Reperfusionsschadens, erklären. Dies erklärt jedoch nicht die Diskrepanz zwischen nestinpositivem Endothel am 9. postoperativen Tag nach allogener, nicht aber nach isogener Transplantation. Denkbar ist eine Induktion der Nestinproduktion durch Zytokine, die während der akuten Abstoßungsperiode freigesetzt werden. So induziert bspw. TGF- $\beta$ 1 in kultivierten renalen Fibroblasten der Zelllinie NRK-49F die Nestinexpression [100] und gilt als wesentlich fibrotisch wirkender Faktor in der Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose [102]. Zakrzewicz et al. [140] konnten jedoch zeigen, dass intravaskuläre Leukozyten während der akuten Abstoßungsperiode nach F344 $\rightarrow$ Lewis Transplantation keine signifikant erhöhte Expression von TGF- $\beta$ 1 aufzeigen. Die Zellzahl ist zu diesem Zeitpunkt allerdings um den Faktor 15 erhöht [51], was somit dennoch zu erhöhten Werten von TGF- $\beta$ 1 führt. In welchem Maße TGF- $\beta$ 1 durch Leukozyten exprimiert wird, die das Gewebe infiltrieren, ist bisher nicht untersucht. Weiterhin ist es möglich, dass TGF- $\beta$ 1 vor dem 9. postoperativen Tag vermehrt exprimiert wird und somit die Nestinexpression bereits zuvor eingeleitet wird. Zudem ist nicht untersucht, ob andere Zytokine ebenfalls in der Lage sind, Nestinexpression zu induzieren.

Die Beobachtung nestinpositiver Endothelzellen in allogenen Transplantaten ist besonders interessant, da diese Transplantate eine CAV mit Intimaprolieration und Lumenobliteration entwickeln. Die Pathogenese der CAV wurde unter 1.3.2.5 ausführlich beschrieben. Es kommt im Wesentlichen zur Bildung einer Neointima durch  $\alpha$ -SMA positive Zellen, deren Ursprung bisher ungeklärt ist [15]. Es ist möglich, dass es sich um durch EndMT umdifferenzierte Endothelzellen handelt [66], um SMCs der arteriellen Media [75, 145] oder um Fibroblasten der Adventitia [107], die in die Intima migrieren. Des Weiteren hat der Nachweis zirkulierender Progenitorzellen, wie SMPC [112] oder EPC [5], eine Debatte über den Beitrag von Empfängerzellen zur CAV angestoßen. Hier sollte in Zukunft eine eindeutige Zuordnung nestinpositiver Zellen zu Spender oder Empfänger, bspw. durch Doppelfärbungen mit gegen MHC-I-Antigene gerichtete Antikörper oder durch geschlechtsübergreifende Transplantation, erfolgen.

Es bleibt jedoch zu erwähnen, dass nestinpositives Endothel während der Phase des chronischen Gefäßumbaus, womöglich aus methodischen Gründen, nicht mehr nachgewiesen konnte, sondern lediglich während der Phase der akuten Abstoßungsepisode. Es ist jedoch durchaus möglich, dass die CAV während der akuten Abstoßungsepisode eingeleitet wird, da akute Abstoßungsepisoden der wichtigste Risikofaktor der CAN sind [3, 58].

#### **4.5.3 Nestinimmunreaktive Zellen in der Nähe von Monozyten/Makrophagen**

Da allogene Transplantate am 9. postoperativen Tag massiv durch monozytäre Zellen infiltriert sind [141] haben wir Doppelfärbungen mit dem monozyten-/makrophagenspezifischen Antikörper ED1 [30] durchgeführt, der ein CD68-artiges Antigen erkennt. Hierbei konnten einige wenige Zellen identifiziert werden, die Immunreaktivität gegenüber Nestin und ED1 aufwiesen. Da die histologischen Präparate mittels Lichtmikroskopie ausgewertet wurden, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich um übereinander liegende Zellen handelt, die lichtmikroskopisch lediglich doppelt gefärbt erscheinen. Um dies auszuschließen, sollten entsprechende Experimente mittels Konfokal- oder Elektronenmikroskopie durchgeführt werden, was den Rahmen dieser Arbeit jedoch gesprengt hätte. Weiterhin ist es denkbar, dass die doppelte Immunreaktivität durch die Phagozytose nestinhaltiger Zellen durch ED1 positive Zellen zustande kommt. Sakairi et al. [100] haben am Rattenmodell der unilateralen Ureterobstruktion ebenfalls Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen Nestin und dem ED1-Antikörper durchgeführt und konnten keine doppelt immunreaktiven Zellen nachweisen.

In unseren Untersuchungen fiel auf, dass sich monozytäre Zellen häufig in der Nähe nestinpositiver Zellen aufhalten und insbesondere Monozyten mit nestinpositivem Endothel interagieren. Eine ähnliche räumliche Nähe lässt sich zwischen Makrophagen und nestinpositiven Zellen der Adventitia beobachten. Diese Interaktion ist reine Beobachtung, eine tatsächliche Interaktion oder eine Induktion von Nestin durch monozytäre Zellen ist jedoch denkbar. So sind monozytäre Zellen u.a. in der Lage TGF- $\beta$  zu exprimieren, das wie bereits für renale Fibroblasten beschrieben, in der Lage ist, Nestinexpression zu induzieren [100]. Des Weiteren gilt TGF- $\beta$  als Induktor von EndMT [68], was eine mögliche Quelle interstitieller nestinpositiver Zellen darstellt [2, 100, 123] und womöglich eine wichtige Rolle für die Pathogenese der CAN spielt [142]. Es ist auch denkbar, dass Vorläuferzellen mit myeloidem Phänotyp [80, 115] zur Pathogenese der CAV beitragen und dass solche Zellen die Expression des Progenitorzellmarkers Nestin aufweisen. Salama et al. [101] konnten kürzlich zeigen,

dass von Monozyten abstammende Progenitorzellen in Patienten mit CAV signifikant erhöhte proliferative Aktivität aufweisen.

## 4.6 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Expression des Intermediärfilamentproteins und Progenitorzellmarkers Nestin durch die zwei wesentlichen Risikofaktoren der CAN, Ischämie-/Reperfusionsschaden und akute Abstoßung, induziert wird. Der deutliche Nachweis interstitieller und endothelialer nestinpositiver Zellen in allogenen Transplantaten legt die Vermutung nahe, dass Nestinexpression zu interstitieller Fibrose und chronischem Gefäßumbau, zwei wichtigen Merkmalen in der Pathogenese der CAN, beiträgt.

Weiterhin konnten wir einige wenige monozytäre Zellen nachweisen, die womöglich Nestin exprimieren. Die Datenlage ist hierzu jedoch nicht eindeutig. Wir konnten jedoch zweifelsfrei eine besondere räumliche Nähe von monozytären und nestinexprimierenden Zellen aufzeigen.

Die Funktion von Nestin ist weitgehend ungeklärt und bleibt auch in dieser Arbeit rein spekulativ. Es gibt starke experimentelle Hinweise darauf, dass Nestin für Prozesse, die in der Pathogenese der CAN eine wichtige Rolle spielen, wie Zellmotilität und -proliferation, notwendig ist. Somit könnten nestinexprimierende Zellen sowohl während akuter Abstoßungsepisoden als auch unmittelbar postoperativ interessante neue präventive oder interventionelle Ansätze in der Behandlung der CAN eröffnen.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Ektope Nestinexpression nach experimenteller Nierentransplantation.

Die CAN ist durch interstitielle Fibrose, Glomerulopathie, Tubulusatrophie und CAV gekennzeichnet. Die CAN stellt zurzeit die bedeutendste Ursache für den Verlust humaner Nierentransplantate dar. Es ist für die moderne Transplantationsmedizin von größter Wichtigkeit, ihre Pathogenese zu verstehen, um interventionelle Ansätze erarbeiten zu können. Nestin ist ein Bestandteil von Intermediärfilamenten und zugleich ein Marker von Vorläuferzellen, die möglicherweise zum chronischen Gewebeumbau im Transplantat beitragen. Um dies zu untersuchen, wurden allogene (F344→Lewis) und isogene (Lewis→Lewis) Nierentransplantationen in Ratten durchgeführt. Isogene und allogene Transplantate wurden jeweils am 9. und 42. postoperativen Tag untersucht. Isogene Transplantate zusätzlich am 4. postoperativen Tag. Die Nestinexpression wurde hierbei mittels Immunhistochemie, quantitativer RT-PCR und Westernblot analysiert (je n=4). Die Nestinimmunreaktivität ist in Nieren nicht transplantierte Kontrolltiere des Stammes Lewis regelhaft auf die Glomeruli und wenige interstitielle Zellen beschränkt. Allogene Transplantate zeigen am 9. postoperativen Tag eine massive Färbung mit Antikörpern gegen Nestin in der arteriellen Intima und zahlreichen interstitiellen Zellen. Am 42. postoperativen Tag ist Nestin im Vergleich zu Kontrollnieren vermehrt nachweisbar, jedoch etwas schwächer als am 9. Tag. Der Nestinnachweis gelang am 42. Tag lediglich in der RT-PCR und dem Westernblot. In der Immunhistochemie zeigte sich ein dem Kontrollniveau ähnliches Bild. Für den 9. postoperativen Tag stimmten die Ergebnisse aller drei Methoden überein. Isogene Transplantate zeigen am 4. postoperativen Tag ebenfalls eine massive Nestinimmunreaktivität in den gleichen Strukturen, die bis zum 9. Tag deutlich abnimmt und am 42. Tag auf das Kontrollniveau zurückkehrt. Die immunhistologischen Ergebnisse bestätigen sich im Westernblot und der RT-PCR. Doppelfärbungen von allogenen Tag 9 Transplantaten mit dem monozyten-/makrophagenspezifischen Antikörper ED1 zeigten zweifelsfrei eine besondere räumliche Nähe und Interaktion monozytärer Zellen mit nestinpositiven Zellen.

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der Nestinproteingehalt der Niere nach isogener und allogener Transplantation erhöht ist. Diese Erhöhung ist im isogenen Transplantat transient, während sie im allogenen Transplantat mindestens 6 Wochen bestehen bleibt. Diese Transplantate entwickeln eine CAN. Die erzielten Daten legen die Vermutung nahe, dass Nestin zur Pathogenese der CAN funktionell beiträgt.

## 5.2 Ectopic nestin expression after experimental kidney transplantation.

CAN is characterized by interstitial fibrosis, glomerulopathy, tubular atrophy and CAV. At present, CAN is the most significant reason for renal graft failure and no therapies are available. Hence, it is of great importance for modern transplantation medicine to understand its pathogenesis, so that new interventional approaches can be achieved. Nestin is a constituent of intermediate filaments and a marker of progenitor cells, which may contribute to chronic graft remodeling. Here we test the hypothesis, that Nestin is over-expressed in renal allografts during the pathogenesis of CAN. Therefore, we performed allogeneic (F344→Lewis) and isogeneic (Lewis→Lewis) kidney transplantations in rats. Iso- and allografts were analyzed 9 and 42 days after transplantation, isografts additionally after 4 days. Nestin expression was analyzed by immunohistochemistry, westernblotting and quantitative RT-PCR (each n=4).

In untreated control kidneys, nestin expression was regularly restricted to glomeruli and very few interstitial cells. Allografts showed 9 days after transplantation a massive staining with antibodies against nestin in the arterial intima and numerous interstitial cells of a fibroblast-like phenotype. Six weeks after allogeneic transplantation nestin expression is still increased, but much weaker compared to day 9 allografts. However, 42 days after allogeneic transplantation nestin expression could be detected by westernblotting and RT-PCR but immunohistochemical analysis showed a staining, which was similar to control kidneys. In day 9 allografts, consistent results were obtained with all three methods.

Day 4 isografts showed a stronger staining compared to day 9 allografts in the same structures, which declines until day 9 and reaches control levels on day 42. The immunohistochemical results were confirmed by westernblotting and RT-PCR. Double-staining of day 9 allografts with the monocyte/macrophage-specific antibody ED1 revealed, that monocytic cells were located in the same microanatomical compartments like nestin-expressing cells. Both cell types seemed to interact.

In conclusion, this study demonstrates that nestin protein levels of rat kidneys are increased after isogeneic and allogeneic transplantation. This increase is transient in isografts, whereas it persists in allografts for at least 6 weeks. These grafts develop a CAN. These achieved data suggests that nestin plays a functional role in the pathogenesis of CAN.

## 6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
allo	allogen
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	alkalische-Phosphatase-anti-alkalische- Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cell</i>
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAN	chronische Allotransplantatnephropathie
CAV	<i>chronic allograft vasculopathy</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
ChAT	Cholinacetyltransferase
ChE	Cholinesterase
CHT1	<i>high affinity choline transporter-1</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDS	Ethan-Dimethyl-Sulfonat
EndMT	<i>endothelial to mesenchymal transition</i>
EPC	<i>endothelial progenitor cells</i>
ES	embryonale Stammzellen
F344	Fischer 344
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
GBM	glomeruläre Basalmembran
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

iso	isogen
kDa	<i>kilodalton</i>
mAChR	muskarinerges Acetylcholinrezeptor
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MMP	Matrix -Metalloproteinasen
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
nAChR	nicotinerges Acetylcholinrezeptor
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NPY	Neuropeptid-Y
NSC	<i>neuroepithelial stem cell</i>
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAN	Puromycin Aminonukleosid
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBGD	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
shRNA	<i>short hairpin ribonucleic acid</i>
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMA	<i>smooth muscle actin</i>
SMC	<i>smooth muscle cell</i>
SMPC	<i>smooth muscle progenitor cells</i>
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGP	Transplantatglomerulopathie
T <sub>H</sub> 1	Typ1-T-Helferzelle
T <sub>H</sub> 2	Typ2-T-Helferzelle
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>

TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VE	voll entsalzt
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7. Abbildungen und Tabellen

### 7.1 Abbildungen

Abbildung 1:	Indirekter Antikörpernachweis mittels PAP bzw. APAAP. ....	31
Abbildung 2:	Indirekter Antikörpernachweis mittels peroxidasemarkiertem Sekundärantikörper .....	33
Abbildung 3:	Immunhistologische Färbung einer Lewis Kontrollniere .....	40
Abbildung 4:	Immunhistologische Färbungen isogener Nierentransplantate im zeitlichen Verlauf. ....	41
Abbildung 5:	Immunhistologische Färbungen allogener Nierentransplantate im zeitlichen Verlauf. ....	42
Abbildung 6:	Doppelfärbungen allogener Nierentransplantate am 9. postoperativen Tag. ....	44
Abbildung 7:	Doppelt immunreaktive Zellen in allogenen Nierentransplantaten am 9. postoperativen Tag. ....	46
Abbildung 8:	Ergebnisse der quantitativen real-time RT-PCR zum Nachweis nestincodierender mRNA. ....	46
Abbildung 9:	Exemplarische Darstellung der gelektrophoretisch aufgetrennten Produkte der quantitativen real-time RT-PCR. ....	47
Abbildung 10:	Nestinimmunreaktivität im Westernblot am 4. postoperativen Tag im isogenen Nierentransplantat. ....	48
Abbildung 11:	Nestinimmunreaktivität im Westernblot. Nestinimmunreaktivität 9 und 42 Tage nach isogener und allogener Transplantation. ....	49

### 7.2 Tabellen

Tabelle 1:	Antikörper für Einzelfärbungen .....	30
Tabelle 2:	Antikörper für Doppelfärbungen. ....	32
Tabelle 3:	Zusammensetzung des <i>mastermix</i> . ....	34
Tabelle 4:	Primer mit Reaktionsbedingungen. ....	36
Tabelle 5:	Rezept für ein 6%iges Trenngel .....	38
Tabelle 6:	Rezept für ein SDS-Sammelgel. ....	38

## 8. Literatur

1. **Abe M, Kawai T, Futatsuyama K, Tanabe K, Fuchinoue S, Teraoka S, Toma H, Ota K.** Postoperative production of anti-donor antibody and chronic rejection in renal transplantation. *Transplantation*. 63:1616-9. 1997.
2. **Ahn KO, Li C, Lim SW, Song HK, Ghee JY, Kim SH, Kim JY, Yoon HE, Cha JH, Kim J, Yang CW.** Infiltration of nestin-expressing cells in interstitial fibrosis in chronic cyclosporine nephropathy. *Transplantation*. 86:571-7. 2008.
3. **Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS.** Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients. *Transplantation*. 55:752-6. 1993.
4. **Amico P, Hönger G, Biemann D, Lutz D, Garzoni D, Steiger J, Mihatsch MJ, Dragun D, Schaub S.** Incidence and prediction of early antibody-mediated rejection due to non-human leukocyte antigen-antibodies. *Transplantation*. 85:1557-63. 2008
5. **Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM.** Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 275:964-7. 1997
6. **Baker RJ, Hernandez-Fuentes MP, Brookes PA, Chaudhry AN, Cook HT, Lechler RI.** Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy. *J Immunol*. 167:7199-206. 2001.
7. **Ball B, Mousson C, Ratignier C, Guignier F, Glotz D, Rife G.** Antibodies to vascular endothelial cells in chronic rejection of renal allografts. *Transplant Proc*. 32:353-4. 2000.
8. **Benham AM, Sawyer GJ, Fabre JW.** Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts. *Transplantation*. 59:1028-32. 1995.
9. **Benichou G, Takizawa PA, Olson CA, McMillan M, Sercarz EE.** Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med*. 175:305-8. 1992.
10. **Benzakour O, Kanthou C, Newman P, Kakkar VV, Kanse SM.** Long-term chemotaxis studies on adherent cells: effect of platelet-derived growth factor-BB on human vascular smooth muscle cell migration. *Anal Biochem*. 230:215-23. 1995.
11. **Bertelli E, Regoli M, Fonzi L, Occhini R, Mannucci S, Ermini L, Toti P.** Nestin expression in adult and developing human kidney. *J Histochem Cytochem*. 55:411-21. 2007.
12. **Bian H, Harris PE, Reed EF.** Ligation of HLA class I molecules on smooth muscle cells with anti-HLA antibodies induces tyrosine phosphorylation, fibroblast growth factor receptor expression and cell proliferation. *Int Immunol*. 10:1315-23. 1998.
13. **Bieri M, Oroszlan M, Farkas A, Ligeti N, Bieri J, Mohacsi P.** Anti-HLA I antibodies induce VEGF production by endothelial cells, which increases proliferation and paracellular permeability. *Int J Biochem Cell Biol*. 41:2422-30. 2009.

14. **Bittmann I, Petersen P, Baretton GB, Land W, Löhrs U.** Evaluation of chronic allograft reaction in kidneys by interphase cytogenetics with centromere-specific DNA probes and immunocytochemistry with regard to distribution of donor and recipient cells. *Transplant Proc.* 27:2033-5. 1995.
15. **Boersema M, Rienstra H, van den Heuvel M, van Goor H, van Luyn MJ, Navis GJ, Popa ER, Hillebrands JL.** Donor and recipient contribution to transplant vasculopathy in chronic renal transplant dysfunction. *Transplantation.* 88:1386-92. 2009.
16. **Bradley JA, Mowat AM, Bolton EM.** Processed MHC class I alloantigen as the stimulus for CD4+ T-cell dependent antibody-mediated graft rejection. *Immunol Today.* 13:434-8. 1992.
17. **Braun MY, McCormack A, Webb G, Batchelor JR.** Mediation of acute but not chronic rejection of MHC-incompatible rat kidney grafts by alloreactive CD4 T cells activated by the direct pathway of sensitization. *Transplantation.* 55:177-82. 1993.
18. **Brenner BM, Cohen RA, Milford EL.** In renal transplantation, one size may not fit all. *J Am Soc Nephrol.* 3:162-9. 1992.
19. **Calderone A.** Nestin+ cells and healing the infarcted heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302:H1-9. 2012.
20. **Cecka JM.** The OPTN/UNOS Renal Transplant Registry. *Clin Transpl.* 1-16, 2005.
21. **Chen HW, Lin AH, Chu HC, Li CC, Tsai CW, Chao CY, Wang CJ, Lii CK, Liu KL.** Inhibition of TNF- $\alpha$ -Induced Inflammation by Andrographolide via Down-Regulation of the PI3K/Akt Signaling Pathway. *J Nat Prod.* 74:2408-13. 2011.
22. **Chen J, Boyle S, Zhao M, Su W, Takahashi K, Davis L, Decaestecker M, Takahashi T, Breyer MD, Hao CM.** Differential expression of the intermediate filament protein nestin during renal development and its localization in adult podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 17:1283-91. 2006.
23. **Citron BA, Suo Z, SantaCruz K, Davies PJ, Qin F, Festoff BW.** Protein crosslinking, tissue transglutaminase, alternative splicing and neurodegeneration. *Neurochem Int.* 40:69-78. 2002.
24. **Conklin BS, Zhao W, Zhong DS, Chen C.** Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am J Pathol.* 160:413-8. 2002.
25. **Cramer DV, Shirwan H** The importance of humoral immune responses in chronic rejection. *Transplantation Rev.* 12:166-176. 1998
26. **Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U.** Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain Res Dev Brain Res.* 84:109-29. 1995.
27. **Daniel C, Albrecht H, Lüdke A, Hugo C.** Nestin expression in repopulating mesangial cells promotes their proliferation. *Lab Invest.* 88:387-97. 2008.
28. **Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D.** Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol.* 167:935-44. 2004
29. **Dawley EM, O Samson S, Woodard KT, Matthias KA.** Spinal cord regeneration in a tail autotomizing urodele. *J Morphol.* 273:211-25. 2012.

30. **Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P, Kraal G.** The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*. 54:589-99. 1985.
31. **Eurotransplant**  
[http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar\\_2010.pdf](http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2010.pdf). Table 4.4a(ii) Kidney transplant characteristics – 2010 (*Stand: 23.09.2011*)
32. **Eurotransplant**  
[http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar\\_2010.pdf](http://www.eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=ar_2010.pdf). Table 4.5(ii) Living donor kidney transplants – kidney-only – 2010 (*Stand: 23.09.2011*)
33. **Fabre J, Lim SH, Morris PJ.** Renal transplantation in the rat: details of a technique. *Aust N Z J Surg*. 41:69-75. 1971.
34. **Florea L, Di Francesco V, Miller J, Turner R, Yao A, Harris M, Walenz B, Mobarry C, Merkulov GV, Charlab R, Dew I, Deng Z, Istrail S, Li P, Sutton G.** Gene and alternative splicing annotation with AIR. *Genome Res*. 15:54-66. 2005.
35. **Furness PN.** Histopathology of chronic allograft dysfunction. *Transplantation*. 71:SS31-6. 2001.
36. **Gasser M, Waaga AM, Kist-Van Holthe JE, Lenhard SM, Laskowski I, Shaw GD, Hancock WW, Tilney NL.** Normalization of brain death-induced injury to rat renal allografts by recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand. *J Am Soc Nephrol*. 13:1937-45. 2002.
37. **Gavard J, Gutkind JS.** VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*. 8:1223-34. 2006.
38. **Grau V, Stehling O, Garn H, Steiniger B.** Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation* 71: 37-46, 2001.
39. **Grigelionienė G, Blennow M, Török C, Fried G, Dahlin I, Lendahl U, Lagercrantz H.** Cerebrospinal fluid of newborn infants contains a deglycosylated form of the intermediate filament nestin. *Pediatr Res*. 40:809-14. 1996.
40. **Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, Savani RC, Gough J, McKenna RM, Stern E, Rush DN.** Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. 345:93-7. 2001.
41. **Hamar P, Szabó A, Müller V, Heemann U.** Involvement of interleukin-2 and growth factors in chronic kidney allograft rejection in rats. *Transplant Proc*. 33:2160-2. 2001.
42. **Hancock WH, Whitley WD, Tullius SG, Heemann UW, Wasowska B, Baldwin WM 3rd, Tilney NL.** Cytokines, adhesion molecules, and the pathogenesis of chronic rejection of rat renal allografts. *Transplantation*. 56:643-50. 1993.
43. **Hancock WW, Buelow R, Sayegh MH, Turka LA.** Antibody-induced transplant arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. *Nat Med*. 4:1392-6. 1998.

44. **Hancock WW, Shi C, Picard MH, Bianchi C, Russell ME.** LEW-to-F344 carotid artery allografts: analysis of a rat model of posttransplant vascular injury involving cell-mediated and humoral responses. *Transplantation*. 60:1565-72. 1995.
45. **Harlan JM, Winn RK.** Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of antiadhesion therapy. *Crit Care Med* 30:S214-219. 2002.
46. **Harris PE, Bian H, Reed EF.** Induction of high affinity fibroblast growth factor receptor expression and proliferation in human endothelial cells by anti-HLA antibodies: a possible mechanism for transplant atherosclerosis. *J Immunol*. 159:5697-704. 1997.
47. **Hauck CR, Hsia DA, Schlaepfer DD.** Focal adhesion kinase facilitates platelet-derived growth factor-BB-stimulated ERK2 activation required for chemotaxis migration of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 275:41092-9. 2000.
48. **Hayashi M, Martinez OM, Garcia-Kennedy R, So S, Esquivel CO, Krams SM.** Expression of cytokines and immune mediators during chronic liver allograft rejection. *Transplantation*. 60:1533-8. 1995
49. **Heeschen C, Jang JJ, Weis M, Pathak A, Kaji S, Hu RS, Tsao PS, Johnson FL, Cooke JP.** Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med*. 7:833-9. 2001.
50. **Herrmann H, Aebi U.** Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 12:79-90. 2000.
51. **Holler J, Zakrzewicz A, Kaufmann A, Wilhelm J, Fuchs-Moll G, Dietrich H, Padberg W, Kuncová J, Kummer W, Grau V.** Neuropeptide Y is expressed by rat mononuclear blood leukocytes and strongly down-regulated during inflammation. *J Immunol*. 181:6906-12. 2008.
52. **Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K, Nagata M.** Podocyte injury promotes progressive nephropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Lab Invest*. 82:25-35. 2002.
53. **Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 246:218-26. 1988.
54. **Jeannot M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS.** Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med*. 282:111-7. 1970.
55. **Jin YP, Korin Y, Zhang X, Jindra PT, Rozengurt E, Reed EF.** RNA interference elucidates the role of focal adhesion kinase in HLA class I-mediated focal adhesion complex formation and proliferation in human endothelial cells. *J Immunol*. 178:7911-22. 2007.
56. **Jindal RM, Hariharan S.** Chronic rejection in kidney transplants. An in-depth review. *Nephron*. 83:13-24. 1999.
57. **Joosten SA, Sijpkens YW, van Ham V, Trouw LA, van der Vlag J, van den Heuvel B, van Kooten C, Paul LC.** Antibody response against the glomerular basement membrane protein agrin in patients with transplant glomerulopathy. *Am J Transplant*. 5:383-93. 2005.

58. **Joosten SA, Sijpkens YW, van Kooten C, Paul LC.** Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. *Kidney Int.* 68:1-13. 2005.
59. **Joosten SA, van Dixhoorn MG, Borrias MC, Benediktsson H, van Veelen PA, van Kooten C, Paul LC.** Antibody response against perlecan and collagen types IV and VI in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol.* 160:1301-10. 2002.
60. **Joosten SA, van Kooten C, Paul LC.** Pathogenesis of chronic allograft rejection. *Transpl Int.* 16:137-45. 2003.
61. **Jurcevic S, Ainsworth ME, Pomerance A, Smith JD, Robinson DR, Dunn MJ, Yacoub MH, Rose ML.** Antivimentin antibodies are an independent predictor of transplant-associated coronary artery disease after cardiac transplantation. *Transplantation.* 71:886-92. 2001.
62. **Kachinsky AM, Dominov JA, Miller JB.** Intermediate filaments in cardiac myogenesis: nestin in the developing mouse heart. *J Histochem Cytochem.* 43:843-7. 1995.
63. **Kao KJ, Scornik JC, Small SJ.** Enzyme-linked immunoassay for anti-HLA antibodies--an alternative to panel studies by lymphocytotoxicity. *Transplantation.* 55:192-6. 1993
64. **Kleeberger W, Bova GS, Nielsen ME, Herawi M, Chuang AY, Epstein JI, Berman DM.** Roles for the stem cell associated intermediate filament Nestin in prostate cancer migration and metastasis. *Cancer Res.* 67:9199-206. 2007.
65. **Koskinen PK, Lemström KB, Häyry PJ.** How cyclosporine modifies histological and molecular events in the vascular wall during chronic rejection of rat cardiac allografts. *Am J Pathol.* 146:972-80. 1995.
66. **Krenning G, Moonen JR, van Luyn MJ, Harmsen MC.** Vascular smooth muscle cells for use in vascular tissue engineering obtained by endothelial-to-mesenchymal transdifferentiation (EnMT) on collagen matrices. *Biomaterials.* 29:3703-11. 2008.
67. **Krieger NR, Yin DP, Fathman CG.** CD4+ but not CD8+ cells are essential for allorejection. *J Exp Med.* 184:2013-8. 1996.
68. **Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, Thum T.** Transforming growth factor- $\beta$ -induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:361-9. 2012.
69. **Kupin W, Nakhleh R, Lee M, Venkat KK, Goggins M, Mozes M, Escobar F, Abouljoud M.** Separate risk factors for the development of transplant glomerulopathy vs chronic tubulointerstitial rejection. *Transplant Proc.* 29:245-6. 1997.
70. **Lacraz S, Nicod L, Galve-de Rochemonteix B, Baumberger C, Dayer JM, Welgus HG.** Suppression of metalloproteinase biosynthesis in human alveolar macrophages by interleukin-4. *J Clin Invest.* 90:382-8. 1992.
71. **Lacraz S, Nicod LP, Chicheportiche R, Welgus HG, Dayer JM.** IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest.* 96:2304-10. 1995.
72. **Land W, Messemer K.** The Impact of Ischemia/Reperfusion Injury on Specific and Non-Specific, Early and Late Chronic Events After Organ Transplantation. *Transplantation Reviews,* 10:108-127. 1996.

73. **Lechler RI, Batchelor JR.** Restoration of immunogenicity to passenger cell-depleted kidney allografts by the addition of donor strain dendritic cells. *J Exp Med.* 155:31-41. 1982.
74. **Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD.** CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell.* 60:585-95. 1990.
75. **Li F, Zhang X, Jin YP, Mulder A, Reed EF.** Antibody ligation of human leukocyte antigen class I molecules stimulates migration and proliferation of smooth muscle cells in a focal adhesion kinase-dependent manner. *Hum Immunol.* 72:1150-9. 2011.
76. **MacRae TH.** Microtubule organization by cross-linking and bundling proteins. *Biochim Biophys Acta.* 1160:145-55. 1992.
77. **Marco ML.** The Fischer-Lewis model of chronic allograft rejection--a summary. *Nephrol Dial Transplant.* 21:3082-6. 2006.
78. **Marvin MJ, Dahlstrand J, Lendahl U, McKay RD.** A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J Cell Sci.* 111:1951-61. 1998.
79. **Mauyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AA, Schneeberger EE, Colvin RB.** Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol.* 12:574-82. 2001.
80. **Metharom P, Liu C, Wang S, Stalboerger P, Chen G, Doyle B, Ikeda Y, Caplice NM.** Myeloid lineage of high proliferative potential human smooth muscle outgrowth cells circulating in blood and vasculogenic smooth muscle-like cells in vivo. *Atherosclerosis.* 198:29-38. 2008.
81. **Michalczyk K, Ziman M.** Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol.* 20:665-71. 2005.
82. **Mokrý J, Cízková D, Filip S, Ehrmann J, Osterreicher J, Kolár Z, English D.** Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev.* 13:658-64. 2004.
83. **Mokrý J, Nemecek S.** Angiogenesis of extra- and intraembryonic blood vessels is associated with expression of nestin in endothelial cells. *Folia Biol (Praha).* 44:155-61. 1998.
84. **Naruse K, Fujieda M, Miyazaki E, Hayashi Y, Toi M, Fukui T, Kuroda N, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H.** An immunohistochemical study of developing glomeruli in human fetal kidneys. *Kidney Int.* 57:1836-46. 2000.
85. **Nave H, Bedoui S, Moenter F, Steffens J, Felies M, Gebhardt T, Straub RH, Pabst R, Dimitrijevic M, Stanojevic S, von Hörsten S.** Reduced tissue immigration of monocytes by neuropeptide Y during endotoxemia is associated with Y2 receptor activation. *J Neuroimmunol.* 155:1-12. 2004.
86. **Overall CM, Wrana JL, Sodek J.** Independent regulation of collagenase, 72-kDa progelatinase, and metalloendoproteinase inhibitor expression in human fibroblasts by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 264:1860-9. 1989.
87. **Pallet N, Dieudé M, Cailhier J, Hébert M.** The Molecular Legacy of Apoptosis in Transplantation. *Am J Transplant* 12:1378-84. 2012.
88. **Park D, Xiang AP, Mao FF, Zhang L, Di CG, Liu XM, Shao Y, Ma BF, Lee JH, Ha KS, Walton N, Lahn BT.** Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem Cells.* 28:2162-71. 2010.

89. **Paul LC, Muralidharan J, Muzaffar SA, Manting EH, Valentin JF, de Heer E, Kashgarian M.** Antibodies against mesangial cells and their secretory products in chronic renal allograft rejection in the rat. *Am J Pathol.* 152:1209-23. 1998.
90. **Pei R, Lee J, Chen T, Rojo S, Terasaki PI.** Flow cytometric detection of HLA antibodies using a spectrum of microbeads. *Hum Immunol.* 60:1293-302. 1999.
91. **Perrey C, Brenchley PE, Johnson RW, Martin S.** An association between antibodies specific for endothelial cells and renal transplant failure. *Transpl Immunol.* 6:101-6. 1998.
92. **Petrossian GA, Nichols AB, Marboe CC, Sciacca R, Rose EA, Smith CR, Cannon PJ, Reemtsma K, Powers ER.** Relation between survival and development of coronary artery disease and anti-HLA antibodies after cardiac transplantation. *Circulation.* 80:III122-5. 1989.
93. **Piazza A, Poggi E, Borrelli L, Servetti S, Monaco PI, Buonomo O, Valeri M, Torlone N, Adorno D, Casciani CU.** Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation.* 71:1106-12. 2001.
94. **Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, Raghov R.** Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest.* 90:1479-85. 1992.
95. **Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, Kusaka M, Beato F, Tullius SG, Neuhaus P, Hancock WW, Tilney NL.** Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. *J Am Soc Nephrol.* 12:2474-81. 2001.
96. **Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P.** Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 346:5-15. 2002.
97. **Russell PS, Chase CM, Winn HJ, Colvin RB.** Coronary atherosclerosis in transplanted mouse hearts. II. Importance of humoral immunity. *J Immunol.* 152:5135-41. 1994.
98. **Rutherford C, Martin W, Salame M, Carrier M, Anggård E, Ferns G.** Substantial inhibition of neo-intimal response to balloon injury in the rat carotid artery using a combination of antibodies to platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor. *Atherosclerosis.* 130:45-51. 1997.
99. **Sahlgren CM, Mikhailov A, Hellman J, Chou YH, Lendahl U, Goldman RD, Eriksson JE.** Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J Biol Chem.* 276:16456-63. 2001.
100. **Sakairi T, Hiromura K, Yamashita S, Takeuchi S, Tomioka M, Ideura H, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Nangaku M, Takeuchi T, Nojima Y.** Nestin expression in the kidney with an obstructed ureter. *Kidney Int.* 72:307-18. 2007.
101. **Salama M, Andrukhova O, Roedler S, Zuckermann A, Laufer G, Aharinejad S.** Association of CD14+ monocyte-derived progenitor cells with cardiac allograft vasculopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 142:1246-53. 2011.

102. **Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A.** Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest.* 112:1486-94. 2003.
103. **Sawyer GJ, Dalchau R, Fabre JW.** Indirect T cell allorecognition: a cyclosporin A resistant pathway for T cell help for antibody production to donor MHC antigens. *Transpl Immunol.* 1:77-81. 1993.
104. **Sayegh MH.** Why do we reject a graft? Role of indirect allorecognition in graft rejection. *Kidney Int.* 56:1967-79. 1999.
105. **Sejersen T, Lendahl U.** Transient expression of the intermediate filament nestin during skeletal muscle development. *J Cell Sci.* 106:1291-300. 1993.
106. **Serón D, Arns W, Chapman JR.** Chronic allograft nephropathy--clinical guidance for early detection and early intervention strategies. *Nephrol Dial Transplant.* 23:2467-73. 2008.
107. **Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A.** Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation.* 94:1655-64. 1996.
108. **Shirwan H.** Chronic allograft rejection. Do the Th2 cells preferentially induced by indirect alloantigen recognition play a dominant role? *Transplantation.* 68:715-26. 1999.
109. **Shishido S, Asanuma H, Nakai H, Mori Y, Satoh H, Kamimaki I, Hataya H, Ikeda M, Honda M, Hasegawa A.** The impact of repeated subclinical acute rejection on the progression of chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 14:1046-52. 2003.
110. **Sijpkens YW, Doxiadis II, De Fijter JW, Mallat MJ, van Es LA, De Lange P, Zwinderman AH, Westendorp RG, van Kemenade FJ, Bruijn JA, Claas FH, Paul LC.** Sharing cross-reactive groups of MHC class I improves long-term graft survival. *Kidney Int.* 56:1920-7. 1999
111. **Sijpkens YW, Joosten SA, Wong MC, Dekker FW, Benediktsson H, Bajema IM, Bruijn JA, Paul LC.** Immunologic risk factors and glomerular C4d deposits in chronic transplant glomerulopathy. *Kidney Int.* 65:2409-18. 2004.
112. **Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, Wang S, Caplice NM.** Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation.* 106:1199-204. 2002.
113. **Sjöberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T.** Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp Cell Res.* 214:447-58. 1994.
114. **Su W, Chen J, Yang H, You L, Xu L, Wang X, Li R, Gao L, Gu Y, Lin S, Xu H, Breyer MD, Hao CM.** Expression of nestin in the podocytes of normal and diseased human kidneys. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292:R1761-7. 2007.
115. **Sugiyama S, Kugiyama K, Nakamura S, Kataoka K, Aikawa M, Shimizu K, Koide S, Mitchell RN, Ogawa H, Libby P.** Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood. *Atherosclerosis.* 187:351-62. 2006.
116. **Süsal C, Opelz G.** Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation.* 73:1269-73. 2002.

117. **Suzuki S, Namiki J, Shibata S, Mastuzaki Y, Okano H.** The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. *J Histochem Cytochem.* 58:721-30. 2010.
118. **Takada M, Nadeau KC, Hancock WW, Mackenzie HS, Shaw GD, Waaga AM, Chandraker A, Sayegh MH, Tilney NL.** Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation.* 65:1533-42. 1998.
119. **Takahashi N, Itoh MT, Ishizuka B.** Human chorionic gonadotropin induces nestin expression in endothelial cells of the ovary via vascular endothelial growth factor signaling. *Endocrinology.* 149:253-60. 2008.
120. **Takano K, Kawasaki Y, Imaizumi T, Matsuura H, Nozawa R, Tannji M, Suyama K, Isome M, Suzuki H, Hosoya M.** Development of glomerular endothelial cells, podocytes and mesangial cells in the human fetus and infant. *Tohoku J Exp Med.* 212:81-90. 2007.
121. **Takemoto SK, Terasaki PI, Gjertson DW, Cecka JM.** Twelve years' experience with national sharing of HLA-matched cadaveric kidneys for transplantation. *N Engl J Med.* 343:1078-84. 2000.
122. **Tohyama T, Lee VM, Rorke LB, Marvin M, McKay RD, Trojanowski JQ.** Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells. *Lab Invest.* 66:303-13. 1992.
123. **Tomioka M, Hiromura K, Sakairi T, Takeuchi S, Maeshima A, Kaneko Y, Kuroiwa T, Takeuchi T, Nojima Y.** Nestin is a novel marker for renal tubulointerstitial injury in immunoglobulin A nephropathy. *Nephrology.* 15:568-74. 2010.
124. **Tullius SG, Nieminen M, Bechstein WO, Jonas S, Steinmüller T, Qun Y, Pratschke J, Graser E, Sinha P, Volk HD, Neuhaus P, Tilney NL.** Contribution of early acute rejection episodes to chronic rejection in a rat kidney retransplantation model. *Kidney Int.* 53:465-72. 1998.
125. **Tullius SG, Tilney NL.** Both alloantigen-dependent and -independent factors influence chronic allograft rejection. *Transplantation.* 59:313-8. 1995.
126. **Vaillant B, Chiaramonte MG, Cheever AW, Soloway PD, Wynn TA.** Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the th response: new insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 167:7017-26. 2001.
127. **Vanstherthem D, Gossiaux A, Declèves AE, Caron N, Nonclercq D, Legrand A, Toubreau G.** Expression of nestin, vimentin, and NCAM by renal interstitial cells after ischemic tubular injury. *J Biomed Biotechnol.* 2010:193259. 2010.
128. **Vella JP, Spadafora-Ferreira M, Murphy B, Alexander SI, Harmon W, Carpenter CB, Sayegh MH.** Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation.* 64:795-800. 1997.
129. **Waaga AM, Gasser M, Laskowski I, Tilney NL.** Mechanisms of chronic rejection. *Curr Opin Immunol.* 12:517-21. 2000.
130. **Waaga AM, Rocha AM, Tilney NL.** Early risk factors contributing to the evolution of long-term allograft dysfunction. *Transplant Rev.* 11:208-216. 1997.

131. **Wallbrecht K, Drick N, Hund AC, Schön MP.** Downregulation of endothelial adhesion molecules by dimethylfumarate, but not monomethylfumarate, and impairment of dynamic lymphocyte-endothelial cell interactions. *Exp Dermatol.* 20:980-5. 2011
132. **Waltenberger J, Uecker A, Kroll J, Frank H, Mayr U, Bjorge JD, Fujita D, Gazit A, Hombach V, Levitzki A, Böhmer FD.** A dual inhibitor of platelet-derived growth factor beta-receptor and Src kinase activity potently interferes with motogenic and mitogenic responses to PDGF in vascular smooth muscle cells. A novel candidate for prevention of vascular remodeling. *Circ Res.* 85:12-22. 1999.
133. **Wang CY, Naka Y, Liao H, Oz MC, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ.** Cardiac graft intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and interleukin-1 expression mediate primary isograft failure and induction of ICAM-1 in organs remote from the site of transplantation. *Circ Res.* 82:762-72. 1998
134. **Wei RQ, Schwartz CF, Lin H, Chen GH, Bolling SF.** Anti-TNF antibody modulates cytokine and MHC expression in cardiac allografts. *J Surg Res.* 81:123-8. 1999.
135. **White E, Hildemann WH, Mullen Y.** Chronic kidney allograft reactions in rats. *Transplantation.* 8:602-17. 1969.
136. **Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.** Nestin expression--a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci.* 61:2510-22. 2004.
137. **Wilczynska J, Pfeil U, Zakrzewicz A, Dietrich H, Körner C, Hecker A, Wessler I, Padberg W, Kummer W, Grau V.** Acetylcholine and chronic vasculopathy in rat renal allografts. *Transplantation.* 91:263-70. 2011.
138. **Womer KL, Stone JR, Murphy B, Chandraker A, Sayegh MH.** Indirect allorecognition of donor class I and II major histocompatibility complex peptides promotes the development of transplant vasculopathy. *J Am Soc Nephrol.* 12:2500-6. 2011.
139. **Yaoita E, Kawasaki K, Yamamoto T, Kihara I.** Variable expression of desmin in rat glomerular epithelial cells. *Am J Pathol.* 136:899-908. 1990.
140. **Zakrzewicz A, Wilhelm J, Blöcher S, Wilczynska J, Wilker S, Dietrich H, Weimer R, Padberg W, Grau V.** Leukocyte accumulation in graft blood vessels during self-limiting acute rejection of rat kidneys. *Immunobiology.* 216:613-24. 2011.
141. **Zakrzewicz D, Zakrzewicz A, Wilker S, Boedeker RH, Padberg W, Eickelberg O, Grau V.** Dimethylarginine metabolism during acute and chronic rejection of rat renal allografts. *Nephrol Dial Transplant.* 26:124-35. 2011.
142. **Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R.** Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *J Am Soc Nephrol.* 19:2282-7. 2008.
143. **Zeisberg M, Kalluri R.** Fibroblasts emerge via epithelial-mesenchymal transition in chronic kidney fibrosis. *Front Biosci.* 13:6991-8. 2008.
144. **Zeisberg M, Neilson EG.** Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol.* 21:1819-34. 2010.
145. **Zhang X, Rozengurt E, Reed EF.** HLA class I molecules partner with integrin  $\beta 4$  to stimulate endothelial cell proliferation and migration. *Sci Signal.* 3:ra85. 2010.

- 146. Zou J, Yaoita E, Watanabe Y, Yoshida Y, Nameta M, Li H, Qu Z, Yamamoto T.** Upregulation of nestin, vimentin, and desmin in rat podocytes in response to injury. *Virchows Arch.* 448:485-92. 2006.

## 9. Danksagung

*„Lehre tut viel, aber Aufmunterung tut alles.“*

Johann Wolfgang von Goethe

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Veronika Grau für die freundliche Überlassung des Themas und die in jeder Hinsicht hervorragende Betreuung. Ihre Ruhe, Geduld und Kompetenz haben geholfen so manche Hürde bis zur Entstehung dieser Arbeit zu meistern. Auch wäre der zeitliche Rahmen in dem diese Arbeit angefertigt wurde, ohne ihre blitzschnellen Korrekturen der vorgelegten Manuskripte kaum möglich gewesen. Ich bedanke mich für eine stets engagierte und herzliche Betreuung in den letzten Jahren, während der sie mich gefördert und gefordert hat und ich nicht nur fachlich vieles von ihr lernen durfte, sondern sie auch als Menschen kennengelernt habe, der das Herz am rechten Fleck trägt.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlichst beim gesamten Laborteam der Sektion Experimentelle Chirurgie für die Vermittlung der wissenschaftlichen Techniken und den ausnahmslos kollegialen und freundschaftlichen Umgang miteinander. Ich durfte nicht nur das reine Durchführen von Experimenten erlernen, sondern auch, dass es immer gilt das Optimale zu erreichen und niemals Kompromisse zu Lasten der Qualität einzugehen. Insbesondere danke ich Frau Sigrid Wilker für die Vermittlung der proteinbiochemischen Techniken und ihr stets wachsames Auge, Frau Gabriele Fuchs-Moll für die Vermittlung der immunhistochemischen Techniken und das geduldige Heranführen an experimentelles Arbeiten und Dr. Anna Zakrzewicz für die Vermittlung der mikrobiologischen Techniken. Zudem sei namentlich auch Dr. Srebrana Atanasova-Koch, Ulrike Berges, Alena Evers, Andrea Fischer, Dr. Andreas Hecker, Christian Körner, Dr. Stefan Menzler, Kathrin Petri, Sabine Schmitt und Jessica Schmitz gedankt. Sie alle haben dazu beigetragen, dass ich die Zeit im Labor stets in guter Erinnerung behalten werde.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Dieter Müller und Herrn Prof. Dr. Ralf Middendorf aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie für die freundliche Kooperation.

Dank gilt auch meinen Eltern, die mir das Medizinstudium und somit auch die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht haben, sowie meiner langjährigen Partnerin Anne Mickisch und ihren Eltern, die mich in den letzten Jahren in besonderer Weise gefördert und unterstützt haben.

## **10. Lebenslauf**

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Dissertation entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the electronic version of the dissertation.**