

Expression und Lokalisation des neuronalen Stammzellmarkers Nestin in den Gefäßwänden
der Lunge von neugeborenen und adulten Mäusen

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

vorgelegt von Berndt, Claudia Ute Marianne
aus Berlin-Steglitz

Gießen 2011

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

AG Signaltransduktion: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Gutachter: Prof. Dr. R. Middendorff

Gutachter: Prof. Dr. R. Schermuly

Tag der Disputation: 30.11.2011

Für meine Omas und für Sidi

1	EINLEITUNG	7
1.1	Lungenentwicklung	7
1.1.1	Embryonale und fetale Phase	7
1.1.2	Postnatale Phase	8
1.1.3	Die Entwicklung der pulmonalen Vaskulatur	10
1.2	Gefäßerkrankungen in der Lunge	12
1.2.1	Pulmonale Hypertonie.....	12
1.2.1.1	Symptomatik, Therapie und Prognose der pulmonalen Hypertonie	13
1.2.1.2	Pathogenese der pulmonalen Hypertonie	14
1.3	Charakterisierung von Nestin	15
1.3.1	Entdeckung von Nestin in neuronalen Vorläuferzellen	15
1.3.2	Nestin ist ein Intermediärfilament.....	16
1.3.3	Charakterisierung der Nestin-Expression anhand von transgenen Nestin-GFP-Mäusen	17
1.3.4	Vorkommen von Nestin-exprimierenden Zellen.....	19
1.3.4.1	Nestin-Expression in organspezifischen Progenitorzellen.....	19
1.3.4.2	Nestin-Expression in adulten Tieren	19
1.3.4.3	Vermehrte Nestin-Expression bei Verletzung des Gewebes.....	20
1.3.4.4	Nestin-Expression in Tumoren.....	21
1.3.4.5	Nestin-Expression bei Neovaskularisation.....	21
1.3.4.6	Nestin-Expression in reifen Blutgefäßen	22
1.3.4.7	Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen als Nestin-exprimierende Vorläuferzellen.....	23
2	FRAGESTELLUNG	24
3	MATERIAL UND METHODEN	25
3.1	Material	25
3.1.1	Herkunft des Untersuchungsmaterials.....	25

3.1.2	Antikörper	26
3.1.2.1	Primärantikörper in der Immunfluoreszenz	26
3.1.2.2	Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz	26
3.1.2.3	Primärantikörper im Western Blot	27
3.1.2.4	Sekundärantikörper im Western Blot	27
3.2	Methoden.....	28
3.2.1	Immunfluoreszenz	28
3.2.1.1	Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	28
3.2.1.2	Durchführung	28
3.2.2	Proteinpräparation aus Geweben.....	29
3.2.2.1	Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	29
3.2.2.2	Durchführung	29
3.2.3	Western Blot.....	30
3.2.3.1	Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen	30
3.2.3.2	Durchführung	31
4	ERGEBNISSE.....	32
4.1	Nestin-GFP-Expression in den Gefäßwänden der Lunge	32
4.2	Nestin-GFP-Expression in allen Gefäßabschnitten in der Lunge.....	34
4.3	Nestin-GFP-Lokalisation innerhalb der Gefäßwände	37
4.3.1	Nestin-GFP-Expression in Wänden größerer Gefäße (Arterien, Arteriolen, Venen) 38	
4.3.1.1	Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 in größeren Gefäßen	38
4.3.1.2	Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in größeren Gefäßen.....	47
4.3.2	Nestin-GFP-Expression in Kapillaren.....	55
4.3.2.1	Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 in Kapillaren	56
4.3.2.2	Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in Kapillaren.....	60

4.4	Übereinstimmung des Nestin-GFP-Signals mit der immunreaktiven Nestin-Expression	62
4.5	Unterschiede der Nestin-Expression in neugeborenen und adulten Mäusen	66
5	DISKUSSION	71
5.1	Vergleich der Nestin-GFP-Expression mit der Nestin-Immunreaktivität.....	71
5.2	Lokalisation von Nestin-exprimierenden Zellen	73
5.2.1	Exakte Lokalisation der Nestin-Expression der Gefäßwand: glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten	74
5.2.2	Analogie von Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten....	76
5.3	Nestin-exprimierende Gefäßwandzellen als Progenitorzellen	78
5.3.1	Vaskuläre Progenitorzellen in Gefäßwänden – wichtig für den Erhalt der Gefäßwände und für die Bildung extravaskulärer organspezifischer Zelltypen?	80
5.3.2	Rolle der Progenitorzellen bei pathophysiologischen Veränderungen der Gefäßwände und des Lungengewebes	83
5.3.3	Neuronale Charakteristika und Potential der Progenitorzellen in den Gefäßwänden der Lunge.....	85
6	ZUSAMMENFASSUNG	87
7	SUMMARY	89
8	LITERATURVERZEICHNIS	91
9	ERKLÄRUNG	99
10	DANKSAGUNG	100

1 Einleitung

1.1 Lungenentwicklung

Während der Entstehung und Entwicklung der Lunge sind viele Veränderungen der Strukturen zu beobachten (Ni et al. 2010, Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975). Kurz nach der Geburt findet als Anpassungsmechanismus eine Umstellung von pränatalen auf postnatale Strukturen statt (Duncker und Kummer 2008). Ausgeprägte Proliferation und Differenzierung von Zellen ist in dieser Zeit zu vermerken (Amy et al. 1977, Burri 1974).

Die Entwicklung der Lunge lässt sich in drei Zeitabschnitte einteilen: in eine Embryonalperiode, in der die Organanlage entwickelt wird, in eine Fetalperiode, in der sowohl der luftleitende Bronchialbaum voll angelegt als auch der gasaustauschende terminale Bronchialbaum mit den Anlagen der Alveolen entwickelt wird, und in eine Postnatalperiode, in der die Alveolen weiter ausgebildet werden und die Lunge zu ihrer adulten Form heranwächst (Duncker und Kummer 2008).

1.1.1 Embryonale und fetale Phase

In der Embryonalperiode beginnt die Lungenentwicklung mit der Abfaltung der Lungenanlage aus der Laryngotrachealrinne. Es findet eine Aufteilung in die beiden Lungenknospen statt. Am Ende der Embryonalperiode sind alle Lappen- und Segmentbronchien ausgebildet und die Lungenarterien und -venen in ihrer spezifischen Lage und mit ihren definitiven Anschlüssen angelegt (Duncker und Kummer 2008).

In der Fetalperiode lässt sich die Entwicklung des luftleitenden und gasaustauschenden Bronchialbaumes in die pseudoglanduläre Phase, in die kanikuläre Phase und in die alveoläre Phase (sakkuläre Phase) gliedern.

Die pseudoglanduläre Phase erhielt ihren Namen aufgrund der Ähnlichkeit des mikroskopischen Bildes mit einer verzweigten tubulo-azinösen Drüse (Duncker und Kummer 2008, O’Rahilly und Müller 1999). Es wird zuerst ein Epithelbaum gebildet, dessen Äste sich zu Bronchien und Bronchioli entwickeln. In der kanikulären Phase finden das Aussprossen von Kapillaren entlang des kubischen Epithels („Kanäle“) und die Bildung von den respiratorischen Einheiten, den Azini, statt. Durch den sehr engen Kontakt der Kapillaren mit dem Epi-

thel entsteht die Blut-Luft-Schranke. Die Azini sind von Alveolarzellen Typ 2 ausgekleidet, aus denen mit 19 Wochen die Typ 1-Alveolarzellen zu entstehen beginnen (O’Rahilly und Müller 1999). In der alveolären Phase entsteht mit den Ductus und Sacculi alveolares die erste Generation der Alveolen (Duncker und Kummer 2008). Andere Quellen bezeichnen den dritten Teil der fetalen Lungenentwicklung aufgrund der Bildung der endständigen Säckchen als „sakkuläre Phase“ (Moore und Persaud 2007, O’Rahilly und Müller 1999, Moore 1996) und den sich anschließenden Teil, von der späten fetalen Periode bis circa zum 8. Lebensjahr, als die alveoläre Phase (Moore und Persaud 2007, Moore 1996) (Abb. 1).

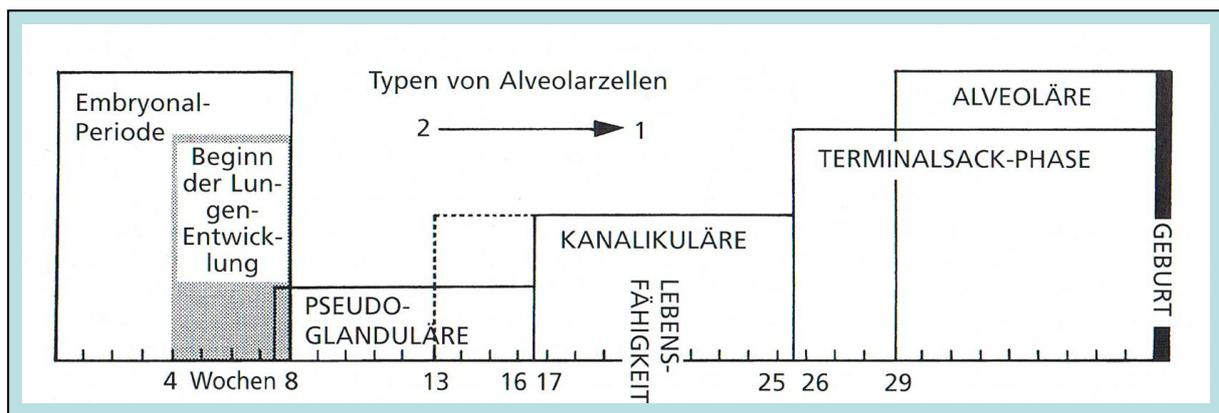


Abb. 1: Phasen in der Lungenentwicklung beim Menschen; die sich überlappenden Phasen, so wie sie gegenwärtig verstanden werden (O’Rahilly und Müller 1999)

1.1.2 Postnatale Phase

Während der Geburt werden die Bronchien, Bronchioli, die Ductus und Sacculi alveolares mit dem ersten Atemzug entfaltet und belüftet (Duncker und Kummer 2008). Das verbliebene Fruchtwasser wird in den ersten Lebensstunden vom Alveolarepithel resorbiert (Duncker und Kummer 2008, Schiebler und Schmidt 2002). Surfactant, eine beim Menschen in der 23.-24. Schwangerschaftswoche gebildete Substanz, vermindert die Oberflächenspannung und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Entfaltung der Lunge (Schiebler und Schmidt 2002). Mit der Entfaltung der Lunge wird diese mit Blut gefüllt und zusätzlich beginnt mit dem Verschließen des Foramen ovale und des Ductus arteriosus der Lungenkreislauf (Duncker und Kummer 2008).

Nach der Geburt, in der neonatalen bzw. postnatalen Phase, treten gravierende Veränderungen der Lungenstruktur auf (Thurlbeck 1975). Die Untersuchung der Lunge von neugeborenen

Mäusen und Ratten zeigte die Abwesenheit von den späteren „richtigen“ Alveolen (Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975); stattdessen werden zum Gasaustausch vorliegende „primäre Sacculae“ bei vielen Spezies, eingeschlossen dem Mensch, beschrieben (Massaro et al. 1985, Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975).

Während des zweiten und dritten postnatalen Tages vergrößern sich die primären Sacculae etwas und neu gebildetes Gewebe ist in den Wänden der Sacculae zu finden. In dieser Phase der Gewebeproliferation entwickeln sich aus den früheren glatten Wänden der primären Sacculae sehr niedrige „sekundäre Kronen“ (Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975). Am dritten und vermehrt am vierten postnatalen Tag werden die primären Sacculae durch die rasche Dehnung der sekundären Kronen in Alveolen unterteilt. Der Wechsel findet ungleichmäßig statt, d.h. nicht alle primären Sacculae werden zur gleichen Zeit zu Alveolen. Die Alveolenbildung mit der Unterteilung aller primären Sacculae in Alveolen beginnt am dritten bzw. vierten Tag und endet circa am vierzehnten Tag mit dem ähnlichen Aussehen einer adulten Lunge (Amy et al. 1977).

Zu Beginn der postnatalen Phase vergrößert sich die Lunge primär durch Expansion (Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975); in dieser kurzen Phase liegt das Lungenwachstum deutlich dem Zuwachs des Körpergewichtes hinterher (Thurlbeck 1975). Am ersten Lebenstag ist kein signifikanter Zuwachs des Lungengewichtes zu verzeichnen, wohingegen das Körpergewicht um circa ein Viertel zunimmt. In der folgenden Zeit wächst das Lungengewicht rasch an und die höchste Rate des Lungenwachstums findet dann parallel zur Wachstumsrate des Körpergewichtes in den ersten sechs postnatalen Tagen statt (Amy et al. 1977). Dieser Anstieg der Wachstumsrate reflektiert wahrscheinlich den Anfang der Umstrukturierung des Lungenparenchyms, die nämlich am vierten Tag beginnende Alveolenbildung (Amy et al. 1977, Burri 1974). Man findet ein rapides Wachstum der alveolären Oberfläche (Thurlbeck 1975). Im weiteren Verlauf zeigt sich die Rate des Lungenwachstums langsamer als die Rate des Wachstums des Körpergewichtes (Amy et al. 1977). Es ist zu bemerken, dass das Lungenvolumen stärker als das Lungengewicht zunimmt, was das anwachsende Verhältnis der Luft in der Lunge zeigt (Thurlbeck 1975).

Die Bildung der Alveolen findet also zwischen dem dritten bzw. vierten und vierzehnten Tag bei Mäusen und Ratten statt (Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975, Burri 1974). Anschließend nimmt die Rate der zellulären Vermehrung und der Bildung der Alveolen deutlich ab. In Fol-

ge findet das Lungenwachstum hauptsächlich durch zelluläre Vergrößerung, Ausdehnung und durch Modifikation von bereits existierenden Strukturen statt (Thurlbeck 1975). Die Alveolen durchlaufen allerdings noch 6-8 weitere Knospungen, ein Prozess, der beim Menschen bis zum 8. Lebensjahr andauert (Schiebler und Schmidt 2002).

1.1.3 Die Entwicklung der pulmonalen Vaskulatur

Die embryonale und fetale Entwicklung der Vaskulatur beginnt mit der Entstehung von Arterien aus endothelialen Vorläuferzellen im Mesenchym und den dazu kommenden glatten Gefäßmuskelzellen. Die Anzahl der glatten Gefäßmuskelzellschichten wächst mit dem Anstieg des Gefäßdurchmessers (Harworth 1995). Studien zeigten, dass Zellen der Neuralleiste zum pulmonalen Gefäßstrang beisteuern (de Ruiter et al. 1989).

Die pulmonalen Arterien entwickeln sich zusammen mit den Luftwegen und verlaufen stets in ihrer weiteren Ausbildung topographisch eng mit den Aufzweigungen des Bronchialbaumes als begleitende Gefäße (Duncker und Kummer 2008, Haworth 1995). Die prä-azinären Äste, die sich proximal von der respiratorischen Region befinden, sind in der 16. Woche des intrauterinen Lebens bereits komplett ausgebildet. In dieser Region findet ferner Wachstum, sogar nach Geburt, nur in Form von Ausdehnung statt (Hislop et al. 1972). Die Lungenvenen, die sich etwas später ausbilden, befinden sich in den Mesenchymsepten zwischen Ästen des sich aufzweigenden Bronchialbaumes (Duncker und Kummer 2008). Im Gegensatz zu den prä-azinären Arterien entwickeln sich die intra-azinären Arterien sehr spät und über die Hälfte werden, wie die Alveolargänge und die Alveoli, nach der Geburt gebildet (Harworth 1995).

Berichtet wird, dass die postnatal eintretende Dilatation der Lungengefäße durch Sauerstoff induziert wird. Sie sei abhängig von dem NO, das vom Endothel produziert wird, und der Aktivierung von verschiedenen K^+ -Kanälen in den pulmonalen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen (Cornfield 2010). Vergrößerte Gefäßdurchmesser und verminderte Gefäßwiderstände wurden beobachtet und die Menge von glatten Gefäßmuskelzellen wurde nicht als reduziert beschrieben (Harworth 1995), wovon Naeye 1961 noch ausging. Die Gefäßwände nehmen postnatal an Dicke ab. Dabei vollzieht sich der Abfall der Wanddicke von kleineren Gefäßen drastischer als die Abnahme bei größeren Gefäßen, bei denen die Reduktion der Wanddicke bis zum Erreichen auf die adulte Wanddicke vier Monate benötigt (Hislop et al. 1973). Bei der postnatalen Adaptation wurde von einer Veränderung des Phänotyps von Endothelzel-

len und glatten Gefäßmuskelzellen berichtet und zwar in der Weise, dass es zu einem rapiden Anstieg der Zelllänge und der Zelloberfläche kommt, was die vergrößerten Gefäßdurchmesser erklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die Vergrößerung des Durchmessers durch den Mangel an interstitiellem Bindegewebe in den Gefäßwänden bei Geburt ermöglicht wird, was eine größere Plastizität erlaubt (Harworth 1995).

Auch die Vaskulatur der Trachea, die als Modell für die Gefäße der Luftwege benutzt wird, wird vor der Geburt als unreif und primitiv bezeichnet. In der postnatalen Phase findet zunächst eine Regression von den existierenden Gefäßen statt und in den folgenden Tagen erfolgt daraufhin eine Neubildung von Gefäßen. Immunreaktivität für α -smooth-muscle-Aktin (SMA) als einen Marker für glatte Muskelzellen fehlte in der embryonalen Entwicklung und wurde erst in der postnatalen Phase nachgewiesen (Ni et al. 2010).

Die in der Lunge als unreif bezeichneten arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen erscheinen bei Geburt bemerkenswerte synthetische Eigenschaften zu haben (Harworth 1995, Hislop et al. 1972). Es wurde darauf hingewiesen, dass sie anfangs eine relativ hohe Menge mRNA für Tropoelastin und Prokollagene exprimieren, die Konzentration von glatten muskelkontraktilen Myofilamenten allerdings niedrig ist (Harworth 1995, Prosser et al. 1989). Die Menge der kontraktilen Myofilamente nimmt in den ersten sechs Lebensmonaten rasch zu und die glatten Gefäßmuskelzellen erlangen einen mehr kontraktilen Phänotyp (Harworth 1995).

1.2 Gefäßerkrankungen in der Lunge

Es ist bekannt, dass chronische Hypoxie, ähnlich wie die durch postnatale Adaptation beobachtete Umstrukturierung des Lungengewebes, zu Veränderungen der Lungenstruktur führt. Eine chronische Hypoxie beeinflusst vor allem den Wandaufbau der pulmonalen Gefäße; es kommt zu einem vaskulären Remodelling mit Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen, wie es auch bei der pulmonalen Hypertonie unterschiedlichster Genese beobachtet werden kann (Simonneau et al. 2009, Yuan et al. 2005).

1.2.1 Pulmonale Hypertonie

Die pulmonale Hypertonie definiert sich durch einen pulmonalarteriellen Mitteldruck in Ruhe über 20 mmHg und unter Belastung über 30 mmHg (Herold 2007, Galiè et al. 2004).

Die pulmonale Hypertonie ist eine seltene Erkrankung und wurde vor mehr als 100 Jahren zum ersten Mal beschrieben. Der Leipziger Internist Ernst Romberg berichtete 1891 von einer ungewöhnlich ausgedehnten Sklerose der Pulmonalarterien mit konsekutiver Hypertrophie der rechten Herzhälfte. Im Jahr 1951 prägte David Dresdale erstmals die Bezeichnung „primäre pulmonale Hypertonie“ bei Patienten mit ätiologisch unklarer pulmonaler Hypertonie (Dony 2009).

Lange Zeit wurde die pulmonale Hypertonie in eine primäre und eine sekundäre Form unterteilt. 1998 wurde im Rahmen der WHO-Expertentagung in Evian (Frankreich) die pulmonale Hypertonie neu klassifiziert und nach ätiologischen, pathogenetischen und therapeutischen Aspekten in fünf Gruppen unterteilt (Golpon et al. 2004). Die Klassifikation wurde zuletzt im Jahr 2009 auf der vierten Weltkonferenz für pulmonale Hypertonie erneuert (Simonneau et al. 2009). Die fünf Gruppen gliedern sich in die pulmonale arterielle Hypertonie (Gruppe 1), u.a. mit den Untergruppen der hereditären und idiopathischen Formen (Gruppe 1.1 und 1.2), und den ursächlich bedingten Formen der pulmonalen Hypertonie (Gruppe 2-Gruppe 5). Zu den hereditären Formen gehört die Mutation des BMPR2-Gens (50% der familiären pulmonalen arteriellen Hypertonien). Ursachen der pulmonalen Hypertonie sind Linksherzerkrankungen (Gruppe 2), Lungenkrankheiten und/oder Hypoxie (Gruppe 3), thromboembolische Ereignisse (Gruppe 4) und verschiedene Erkrankungen wie z.B. Sarkoidose, Histiozytosis X und Glykogenstoffwechselerkrankungen (Gruppe 5) (Simonneau et al. 2009, Herold 2007).

1.2.1.1 Symptomatik, Therapie und Prognose der pulmonalen Hypertonie

Bei der pulmonalen Hypertonie treten anfangs Symptome wie abnehmende Leistungsfähigkeit, leichte Belastungsdyspnoe, Sinustachykardie und Schwindel auf. Schwerwiegendste Veränderungen im Herz-Kreislaufsystem und eine Rechtsherzinsuffizienz mit Halsvenenstauung, Ödemen, und Stauungsleber als Folge eines Cor pulmonale werden im weiteren Verlauf beobachtet (Herold 2007, Galiè et al. 2004).

Aktuelle Therapieansätze für die idiopathische pulmonale Hypertonie bewirken hauptsächlich die Verminderung der Symptome und die Verbesserung der Prognose (Schermyly et al. 2005). Ein kurativer Ansatz ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht bekannt. Therapien mit Prostazyklinderivaten, Endothelin-Rezeptor-Antagonisten und Phosphodiesterase-Inhibitoren zur Drucksenkung im pulmonalen Kreislauf werden durchgeführt (Herold 2007, Olschewski et al. 2006, Galiè et al. 2004). Zusätzlich werden Cumarine zur Antikoagulation zur Verhinderung der Entstehung von Lungenembolien gegeben (Olschewski et al. 2006, Galiè et al. 2004). Eine auftretende Herzinsuffizienz wird mit körperlicher Schonung, Diuretika, ACE-Hemmern und Herzglykosiden behandelt (Herold 2007, Olschewski et al. 2006, Galiè et al. 2004).

Die Lebenserwartung der an der idiopathischen (primären) pulmonalen Hypertonie erkrankten Patienten lag in den 80-iger Jahren von der Diagnosestellung bis zum Tod aufgrund der fortschreitenden Rechtsherzinsuffizienz im Median bei 2,8 Jahren (D'Alonzo et al. 1991). Seit der Einführung von intravenösen Prostazyklinen in den 90-iger Jahren und weiteren Forschungen haben die Patienten eine bessere Aussicht (Runo et al. 2003). Dabei handelt es sich bei der rechtsventrikulären Adaptation um einen der wichtigsten prognostischen Faktoren bei der pulmonalen Hypertonie (Olschewski et al. 2006).

1.2.1.2 Pathogenese der pulmonalen Hypertonie

Bei der pulmonalen Hypertonie ist der pulmonalarterielle Druck und der vaskuläre Widerstand erhöht, was auf einer fortwährenden pulmonalen Vasokonstriktion und Obliteration des Gefäßlumens beruht (Yuan et al. 2005, Humbert et al. 2004). Betroffen sind bei der familiären und idiopathischen pulmonalen Hypertonie vor allem kleine und mittelgroße Arterien und Arteriolen, die plexiforme Läsionen, Thrombosen und konzentrisches Verdicken zeigen (Golpon et al. 2005, Yuan et al. 2005, Runo et al. 2003). Das Verdicken der pulmonalen Arterien lässt sich u.a. auf die Fibrose der Intima und die Hypertrophie der Media zurückführen, was durch die exzessive Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt wird (Yuan et al. 2005, Galiè et al. 2004, Runo et al. 2003).

Die prinzipielle Funktion der glatten Gefäßmuskelzellen ist die Kontraktion und Regulation des Durchmessers und des Tonus der Gefäße. Im adulten Organismus sind glatte Gefäßmuskelzellen nicht völlig differenziert. Sie sind fähig, ihren Phänotyp als Antwort auf exogene Stimuli zu verändern. Als Antwort auf eine vaskuläre Verletzung wächst die Rate der Zellproliferation und der Migration von glatten Gefäßmuskelzellen dramatisch an (Owens et al. 2004).

1.3 Charakterisierung von Nestin

1.3.1 Entdeckung von Nestin in neuronalen Vorläuferzellen

Das Intermediärfilament Nestin wurde zuerst in neuronalen Vorläuferzellen gesehen und verdankt dieser Entdeckung seinen Namen (Akronym: neuroepithelial stem cell protein) (Lendahl et al. 1990).

Lendahl et al. (1990) beschrieben einen Genabschnitt, dessen Transkription in neuronalen Stammzellen zu finden ist, als das Nestin-Gen. Das Nestin-Gen wurde früher Rat.401 genannt (Lendahl et al. 1990). Es war bereits gezeigt worden, dass ein Antikörper Rat.401 die Identifikation von neuronalen Stammzellen ermöglicht (Hockfield et al. 1985). Der Antikörper Rat.401 markiert vorübergehend einen sehr großen Anteil von Zellen im embryonalen Gehirn. Im adulten Gehirn dagegen exprimieren weder Neurone noch Gliazellen das von dem Antikörper Rat.401 zu erkennende Epitop (Frederiksen et al. 1988). Lediglich adulte neuronale Stammzellen, die nur in bestimmten Teilen des Gehirns mit bestehender Neurogenese zu finden sind, weisen eine Nestin-Expression auf (Xu et al. 2006, Mignone et al. 2004).

Die ganze Länge vom Transkript des Nestin-Gens ohne Poly-A-Schwanz beträgt 5945 bp. Beim Vergleich der Sequenzen der cDNA und der genomischen Klone sind drei Introns an den Positionen 912, 1038 und 1111 des Transkriptes identifiziert worden. Die Aminosäuresequenz von Nestin charakterisiert es als ein Intermediärfilament. Sein Molekulargewicht entspricht annäherungsweise 200.000 (Lendahl et al. 1990).

Nestin wird von neuronalen Stammzellen, die für die Vielfalt von verschiedenen Zellen im adulten und in dem sich entwickelnden Gehirn verantwortlich sind, exprimiert (Mignone et al. 2004, Lendahl et al. 1990). Die Nestin-Expression wird beim Übergang von proliferierenden Stammzellen zu den postmitotischen Neuronen deutlich herunterreguliert (Zimmerman et al. 1994). Die neuronalen Stammzellen führen schließlich zu der Bildung von Neuronen und Gliazellen, die nach Differenzierung keine Nestin-Expression zeigen (Alvarez-Buylla et al. 2001, Lothian et al. 1997, Lendahl et al. 1990).

1.3.2 Nestin ist ein Intermediärfilament

Bei dem Protein Nestin handelt es sich um ein Intermediärfilament vom Typ 6 (Lendahl et al. 1990). Intermediärfilamente haben im Allgemeinen eine Stützfunktion in den Zellen (Goldman et al. 2008, Eliasson et al. 1999, Fuchs et al. 1998). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Organisation der Organellen durch Veränderung ihrer Beweglichkeit und den Besitz von fixierenden Strukturen innerhalb des Zytoplasmas (Goldman et al. 2008). Somit sichern sie den Zellen eine flexible Struktur und wirken, den von außen auf die Zellen eingreifenden Faktoren entgegen (Goldman et al. 2008, Fuchs et al. 1998). Mutationen von Intermediärfilamenten können zu einem schwachen strukturellen Netzwerk der Zellen führen, was die Gefahr der Ruptur der Zellen zur Folge hat und somit die Ursache von einer Vielzahl von Krankheiten darstellt (Fuchs et al. 1998).

Es gibt auch Hypothesen über weiterführende Funktionen von Intermediärfilamenten (Magin et al. 2004). Intermediärfilamente könnten für eine Signaltransduktion von der Peripherie der Zelle zum Nukleus sorgen (Goldman et al. 2008). Veränderungen der Struktur von Intermediärfilamenten haben möglicherweise einen wesentlichen Effekt auf die Signaltransduktion und Genexpression (Magin et al. 2004).

Für gewöhnlich wird Nestin vorübergehend in neuronalen Vorläuferzellen exprimiert und mit der weiteren Differenzierung der Zelle durch andere endgültige Intermediärfilamente ersetzt (Cattaneo et al. 1990). Im adulten Gehirn exprimieren Neurone als Intermediärfilamente die Neurofilamente und Astrozyten GFAP (glial fibrillary acidic protein) (Lendahl et al. 1990, Leonard et al. 1988). Insgesamt erlaubt die Entdeckung von Nestin zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen zu unterscheiden (Mokry et al. 2004).

1.3.3 Charakterisierung der Nestin-Expression anhand von transgenen Nestin-GFP-Mäusen

Zur Lokalisation der Nestin-Expression wurden neben immunhistochemischen Untersuchungen auch sog. Nestin-GFP-Mäuse genutzt. Dies sind genetisch veränderte Mäuse, bei denen die Expressionen von Nestin und des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) miteinander gekoppelt wurden. Derartige Mäusestämme sind von mehreren Laboren gezüchtet worden (Bernardo et al. 2006, Mignone et al. 2004, Yamaguchi et al. 2000).

Zur Herstellung der von uns genutzten Nestin-GFP-Mäuse begann die Enikolopov-Gruppe (Mignone et al. 2004) mit dem Subklonieren von Fragmenten des Nestin-Gens in den Vektor pBSM13⁺. Ein 5.8-kb-Fragment bestand aus der Promotorregion und ein 1.8-kb-Fragment enthielt das zweite Intron. Beide Fragmente wurden mit der cDNA der enhanced Version des GFP (EGFP) kombiniert. Es erfolgte eine Polyadenylierung von Sequenzen vom SV40 und eine Klonierung in den pBSM13⁺-Vektor zum Generieren des Nestin-GFP-Plasmids. Im Endprodukt befand sich schließlich die cDNA vom EGFP zwischen dem Promotor und den Sequenzen des zweiten Introns vom Nestin-Gen (Abb. 2) (Mignone et al. 2004).

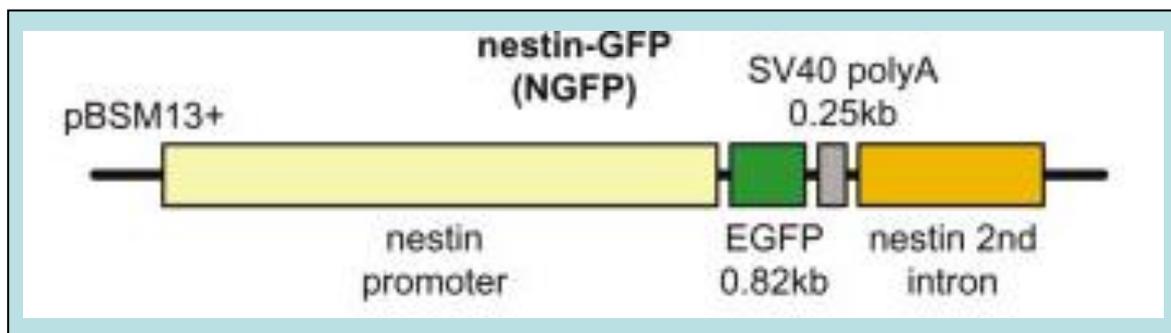


Abb. 2: Schema des Nestin-GFP-Konstruktes; die enhanced Version von GFP (EGFP) wurde unter Kontrolle vom 5.8-kb Promotor und dem 1.8-kb zweiten Intron vom Nestin-Gen platziert (Mignone et al. 2004)

Das Plasmid wurde isoliert und durch Zentrifugieren in Zäsiumchlorid aufbereitet und mit den SmaI-Restriktionsenzymen verdaut. Diese Vorgänge sorgten für die Entfernung der gesamten Basisstruktur des Vektors und ließen dabei die Nestin-GFP-Sequenzen intakt. Ein 8.7-kb-Fragment wurde durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufbereitet und dann in pronukle-

äre fertilisierte Oozyten von C57BL/6 x Balb/cBy gemischten Mäusen injiziert. Die nach der Injektion geborenen Tiere wurden anhand von Primern gescreent. Die genutzten Primer korrespondierten zum einen mit den Sequenzen vom zweiten Intron des Nestins-Gens, zum anderen mit Sequenzen der EGFP-cDNA. Die Nachkommen der männlichen Tiere mit den erwarteten Sequenzen wurden für die weitere Züchtung und somit für die Untersuchungen genutzt (Mignone et al. 2004).

Anhand der hier beschriebenen Nestin-GFP-Mäuse aus der Enikolopov-Gruppe untersuchten einige Studien die Nestin-Expression in verschiedenen Geweben und unterschiedlichen Zellen, z.B. in Satellitenzellen im Muskel (Day et al. 2007), in ovalen Zellen der Leber (Gleiberman et al. 2005), in neuronalen Stamm- und Vorläuferzellen (Mignone et al. 2004), in Vorläuferzellen von Leydig-Zellen im Hoden (Davidoff et al. 2004) und bei Angiogenese in verschiedenen Tumoren (Amoh et al. 2005).

Es existieren neben den erwähnten Nestin-GFP-Mäusen aus der Enikolopov-Gruppe auch transgene Nestin-GFP-Mäuse, die in anderen Laboren hergestellt worden sind (Bernardo et al. 2006, Yamaguchi et al. 2000). Yamaguchi et al. (2000) z.B. führten mit den in ihrem Labor entstandenen Nestin-GFP-Mäusen verschiedene Untersuchungen des Gehirns durch (Sawamoto et al. 2001, Yamaguchi et al. 2000). Bernardo et al. (2006) beschrieben mit Hilfe der in ihrem Labor gezüchteten Nestin/EGFP-Mäuse Vorläuferzellen von endokrinen und exokrinen Zellen im Pankreas.

Das Ablesen des Nestin-Gens wird in den transgenen Nestin-GFP-Mäusen durch das zweite Intron reguliert (Mignone et al. 2004). Dabei soll im zweiten Intron des Nestin-Gens ein neuronaler stammzell-spezifischer Enhancer lokalisiert sein (Lothian et al. 1997, Zimmerman et al. 1994). Dagegen soll das erste Intron einen für Angiogenese spezifischen Enhancer enthalten (Aihara et al. 2004).

Bei der Untersuchung der Nestin-GFP-Expression zeigte sich, dass grüne Fluoreszenz neben dem Zytoplasma der Zellen, dem bekannten Ort der Expression von Nestin als Intermediärfilament, auch im Kern lokalisiert ist (Mignone et al. 2004). Andere sprachen von einer "polarisierten" Expression von Nestin-GFP auf einer Seite vom Kern (Day et al. 2007).

1.3.4 Vorkommen von Nestin-exprimierenden Zellen

Nachdem die Expression von Nestin zuerst ausschließlich neuronalen Vorläuferzellen zugesprochen worden ist, berichten einige andere Studien von der Entdeckung Nestins in diversen weiteren Organen. Den in diesen Organen identifizierten Nestin-exprimierenden Zellen spricht man stammzellähnliche Eigenschaften zu (Wiese et al. 2004).

1.3.4.1 Nestin-Expression in organspezifischen Progenitorzellen

Organspezifische Progenitorzellen, die sich durch Proliferation und Differenzierung charakterisieren lassen, haben im Vergleich zu embryonalen Stammzellen begrenzte Kapazitäten zur Selbsterneuerung und kein karzinogenes Potential (Wiese et al. 2004). Eine Nestin-Expression wurde in Progenitorzellen verschiedener Linien, die sich von embryonalen Stammzellen ableiten, gezeigt (Wiese et al. 2004). In Vorläuferzellen von endokrinen und exokrinen Zellen des sich entwickelnden Pankreas wurde Nestin-Expression entdeckt (Bernardo et al. 2006). Ebenso lag eine Nestin-Expression in der fetalen Niere (Bertelli et al. 2007), in fetalen Zähnen (About et al. 2000) und in dem sich entwickelnden und postnatalen Hoden (Davidoff et al. 2004, Fröjdman et al. 1997) vor. Für gewöhnlich folgte mit dem Erreichen der Differenzierung der Zellen ein Rückgang der Nestin-Expression (Davidoff et al. 2004, Klein et al. 2003).

Es liegen somit einige wenige Studien vor, die über eine Nestin-Expression in organspezifischen Progenitorzellen außerhalb des Gehirns berichten.

1.3.4.2 Nestin-Expression in adulten Tieren

Bei adulten Tieren liegt ebenfalls in einigen Geweben eine Nestin-Expression vor (Klein et al. 2003). Im Gegensatz zum jungen Tier wird jedoch beim adulten Tier die Nestin-Expression herunterreguliert (Day et al. 2007, Davidoff et al. 2004). Neben den Beschreibungen über Nestin-exprimierende Stammzellen im adulten Gehirn (Mignone et al. 2004) ist über eine Nestin-Expression im gesunden adulten Gewebe anderer Organe nicht viel beschrieben. Adulte neuronale Stammzellen befinden sich nur in einer begrenzten Anzahl von Gebieten im Gehirn, nämlich in der lateralen Wand vom Seitenventrikel, im Gyrus dentatus des Hippocampus (Xu et al. 2006), im rostralen Migrationsstrom und im Bulbus olfactorius (Bennett et al. 2010, Mignone et al. 2004).

Es war möglich, im Kortex und in der Medulla der Nebenniere der adulten Ratte Nestin-exprimierende Zellen nachzuweisen. Dabei wird die unregelmäßig vorliegende Nestin-Expression der adrenokortikalen Zellen durch den unterschiedlich ausgeprägten Differenzierungsstatus der Zellen erklärt (Bertelli et al. 2002). Ebenfalls im Sehnerv von adulten Tieren waren Nestin-positive Zellen identifizierbar (Yang et al. 2000).

In den interstitiellen Zellen von Cajal (ICC), die vorwiegend zwischen der zirkulären und longitudinalen Muskelschicht des Gastrointestinaltraktes lokalisiert sind und von denen angenommen wird, von mesenchymalen Stammzellen abzustammen (Young et al. 1996), ist eine Nestin-Expression beschrieben worden (Tsujimura et al. 2001).

1.3.4.3 Vermehrte Nestin-Expression bei Verletzung des Gewebes

Es liegen einige Studien vor, die über einen erneuten Anstieg von Nestin im adulten Tier berichten. Diese erneute Zunahme der Nestin-Expression findet bei Verletzung eines Gewebes statt (Day et al. 2007, Drapeau et al. 2005, Gleiberman et al. 2005, Davidoff et al. 2004, About et al. 2000, Clarke et al. 1994).

Es wurde gezeigt, dass bei Läsionen des Hippocampus (Abdel-Rahman et al. 2004, Clarke et al. 1994) und auch bei genereller Verletzung des Gehirns (Buffo et al. 2008) bestimmte Zellen proliferationsfähig werden können und einige von diesen auch Nestin exprimieren. Diese Zellen werden z.T. als Astrozyten beschrieben, deren Anzahl im Laufe der Heilung wieder sank (Abdel-Rahman et al. 2004, Clarke et al. 1994). Ansonsten werden adulte neurale Stammzellen, die sich in einer definierten Nische mit reifen Strukturen wie Vaskulatur, Astrozyten und Neuronen befinden, für Neurogenese und Astrogliogenese verantwortlich gemacht (Bennett et al. 2010, Hsieh et al. 2010). In menschlichen Gehirnen wurden nach einem Hirninfarkt in den unmittelbar an die Nekrosezone angrenzenden Gebieten Zellen beschrieben, die sog. neugeborene Neurone darstellen. Es wurde berichtet, dass diese Zellen bevorzugt in der Nachbarschaft zu Gefäßen liegen. Als Möglichkeiten der Herkunft dieser Zellen wurde diskutiert, ob sie eingewandert sind (z.B. von der subventrikulären Zone) und die Gefäße zur Migration benutzen oder ob sie lokal entstehen (Jin et al. 2006).

Auch in der Narbe eines Myokardinfarktes wurden Astrozyten mit einer vorliegenden Nestin-Expression beschrieben (Drapeau et al. 2005). Ebenfalls wurden im adulten Skelettmuskel Nestin-positive Satellitenzellen entdeckt, die proliferations- und differenzierungsfähig sind

und zur Reparatur des Skelettmuskels beitragen (Day et al. 2007). Zusätzlich zu den Satellitenzellen werden Perizyten als Zellen im Skelettmuskel mit myogenem Potential beschrieben (Dellavalle et al. 2007). In der Leber existieren ovale Zellen, die bei der Verletzung des Organs auftreten; diese ovalen Zellen exprimieren Nestin (Gleiberman et al. 2005). Im Hoden nach einer toxischen Ethandimethansulphonat (EDS)-Behandlung zur Elimination der bestehenden Leydig-Zell-Population mit nachfolgender Regeneration dieser Zellen wurde eine Nestin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten gezeigt (Davidoff et al. 2004). Auch bei der Untersuchung von Zähnen zeigte sich, dass die Nestin-Expression bei Auftreten von Karies hochreguliert wird (About et al. 2000).

1.3.4.4 Nestin-Expression in Tumoren

In einigen Tumoren wurde eine Nestin-Expression gesehen. Es wurde gezeigt, dass Rhabdomyosarkome das Intermediärfilament Nestin bildeten (Kobayashi et al. 1998). Humane Melanome wiesen ebenfalls eine reichliche Anzahl von Nestin-exprimierenden Zellen auf. Dabei ist zu beachten, dass Melanozyten, aus denen Melanome hervorgehen, neuroektodermalen Ursprungs sind (Flørenes et al. 1994). Gastrointestinale stromale Tumore (GISTs) entstehen aus Stammzellen und zeigten auch eine Nestin-Immunreaktivität. Dagegen war in den sich aus dem Gastrointestinaltrakt entwickelnden Leiomyomen und Schwannomen keine Nestin-Expression zu entdecken (Tsujimura et al. 2001).

1.3.4.5 Nestin-Expression bei Neovaskularisation

Nestin-Expression wird in Verbindung mit Neovaskularisation bzw. Angiogenese gebracht (Amoh et al. 2005, Mokry et al. 2004). Adulte Neovaskularisation und Nestin-positive Gefäße wurden in Tumoren, im Corpus luteum und in der Narbe eines Myokardinfarktes nachgewiesen (Drapeau et al. 2005, Mokry et al. 2004). Im uterinen Endometrium und Myometrium, wo sich die Bildung und der Abbau von Gefäßen in jedem Menstruationszyklus wiederholt, wurden Nestin-exprimierende Gefäße beschrieben (Aihara et al. 2004).

In Gefäßen verschiedener Tumoren, eingeschlossen Lungen-, Magen-, Kolon- und Zervixkarzinomen, wurde eine Nestin-Immunreaktivität beobachtet (Teranishi et al. 2007, Aihara et al. 2004, Kim et al. 2002). Eine Nestin-Färbung war ebenfalls in Gefäßen von Melanoblastomen und Glioblastomen zu beobachten (Mokry et al. 2004). Die Untersuchung von Gliomen ließ

Nestin-positive Gefäße erkennen; dabei verhielt sich die Intensität der Färbung annäherungsweise parallel zu den Maglinitätsgraden der Tumore (Sugawara et al. 2002). Ähnlich verhielt es sich mit den kolorektalen Tumoren. Die Prognose war schlechter, wenn die Nestin-positiven Gefäße vermehrt auftraten und eine höhere Dichte aufwiesen (Teranishi et al. 2007). Bei der hier beschriebenen Neovaskularisation wird die Nestin-Expression in den Gefäßen dem sich neu gebildeten Endothel zugeschrieben (Teranishi et al. 2007, Amoh et al. 2005, Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004, Kim et al. 2002, Sugawara et al. 2002). Reife Endothelzellen werden dagegen in den meisten Fällen für Nestin-negativ gehalten (Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004). Somit wird Nestin von einigen Autoren auch als ein Marker für Neovaskularisation angesehen (Mokry et al. 2004).

1.3.4.6 Nestin-Expression in reifen Blutgefäßen

Von einer Nestin-Expression in Blutgefäßen, insbesondere bei Neovaskularisation, ist auszugehen (Teranishi et al. 2007, Amoh et al. 2005, Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004, Kim et al. 2002, Sugawara et al. 2002). Sehr wenige Informationen liegen über eine Nestin-Expression ohne Auftreten von Neovaskularisation vor. So wurden Nestin-exprimierende Gefäße im Muskel in engster Nähe zu Muskelfasern beschrieben (Day et al. 2007).

Bei der Frage der genauen Lokalisation von Nestin in der Gefäßwand herrscht die vorwiegende Meinung, dass Endothelzellen Nestin bilden (s.o. 1.3.4.5.). Allerdings handelte es sich bei den untersuchten Endothelzellen meistens um neu gebildete Endothelzellen (Neovaskularisation) (Teranishi et al. 2007, Amoh et al. 2005, Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004, Kim et al. 2002, Sugawara et al. 2002). Weiter differenzierte Endothelzellen wiesen dagegen in den meisten Fällen keine Nestin-Expression auf (Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004). Bisher wurde erst selten berichtet, dass Nestin in glatten Gefäßmuskelzellen lokalisiert ist (Oikawa et al. 2010, Davidoff et al. 2004, Mokry et al. 2004). Eine Nestin-Expression in Perizyten wurde ebenfalls in wenigen Fällen erwähnt (Dore-Duffy et al. 2006, Aihara et al. 2004, Davidoff et al. 2004).

Über das Vorkommen von Nestin in bestimmten Gefäßabschnitten ist nicht viel beschrieben. Nestin-Expression wird in Gefäßen verschiedener Durchmesser gefunden (Mokry et al. 2004) und tritt dabei vermehrt in der kapillären Region auf (Day et al. 2007, Aihara et al. 2004).

1.3.4.7 Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen als Nestin-exprimierende Vorläuferzellen

Davidoff et al. (2004) fanden eine Nestin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten des postnatalen und des regenerierenden Hodens. Durch die Gabe von dem toxischen EDS wurden die vorliegenden Leydig-Zellen eliminiert. Im Anschluss konnte eine Nestin-Markierung in glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten zusammen mit einer Proliferation dieser Zellen beobachtet werden, die in Folge zu Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen differenzierten. Die Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten, die auch vermehrt Neuroglykan 2 (NG 2) und Platelet-derived growth factor-receptor β (PDGF-R β) produzieren, werden als Vorläuferzellen mit Proliferations- und Differenzierungspotential angesehen (Davidoff et al. 2004).

Über die Existenz von Nestin- und NG2 exprimierenden Perizyten im adulten zentralen Nervensystem, die nach Stimulation zu Zellen der neuronalen Linie differenzieren und somit Stammzell-Aktivität besitzen, wird berichtet (Dore-Duffy et al. 2006). Auch Crisan et al. (2008) beobachteten, dass Perizyten aus verschiedenen Organen, wie Skelettmuskel, Pankreas, Fettgewebe und Plazenta, NG2 und PDGF-R β exprimierten. Die aufbereiteten Perizyten zeigten die Expression von mesenchymalen Stammzellmarkern und myogenes, chondrogenes und adipogenes Potential, was eine Zugehörigkeit von Perizyten zu mesenchymalen Stammzellen nahelegt und die Hypothese unterstützt, dass Blutgefäßwände eine Reserve von Progenitorzellen besitzen (Crisan et al. 2008).

2 Fragestellung

Das Intermediärfilament Nestin gilt als Marker neuronaler Stammzellen. Im Hoden z.B. ist Nestin aber in Gefäßwänden lokalisiert und identifiziert dabei Teile von glatten Gefäßmuskeln und Perizyten als proliferationsfähige Progenitorzellen, die sich zu Leydig-Zellen entwickeln können. Basierend auf der Hypothese, dass vergleichbare Phänomene auch in anderen Organen existieren, sollten in der vorliegenden Arbeit Vorkommen und Lokalisation von Nestin in der Lunge untersucht werden.

Dies ist vor dem Hintergrund gravierender Umbauvorgänge in der Lunge unter physiologischen Bedingungen zu Beginn des Lebens sowie bei pathologischen Vorgängen, wie z.B. beim vaskulären Remodelling der pulmonalen Hypertonie, von besonderem Interesse. Es sollte geklärt werden, ob Nestin-exprimierende Zellen im Sinne von stammzellartigen Progenitorzellen entscheidend an diesen pulmonalen Strukturveränderungen beteiligt sein könnten.

Im Detail sollte untersucht werden, ob Nestin bei Nestin-GFP-transgenen-Mäusen in der Lunge vorkommt und welche Zelltypen Nestin-GFP aufweisen. Es sollte beantwortet werden, ob Nestin-GFP die immunreaktive Nestin-Expression widerspiegelt und ob sich Nestin-Expression und Nestin-GFP-Färbung in der Lunge von adulten und neugeborenen Mäusen unterscheiden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Herkunft des Untersuchungsmaterials

Als Untersuchungsmaterial für die Fluoreszenz-Untersuchungen wurden speziell für Laboruntersuchungen gezüchtete neugeborene und adulte Nestin-GFP-Mäuse und eine entsprechende Anzahl von C57BL/6-Mäusen als Kontrolle herangezogen. Bei den Nestin-GFP-Mäusen erfolgt die GFP-Expression unter der Kontrolle von einem Promotor und einem transkriptionalen Enhancer, der sich im zweiten Intron des Nestin-Gens befindet. Die Züchtung der Nestin-GFP-Mäuse fand im Labor von Grigori Enikolopov, Cold Spring Harbor, NY, USA statt und die Nestin-GFP-Expression wurde von seiner Arbeitsgruppe erstmalig beschrieben (Mignone et al. 2004). Für unsere Untersuchungen standen 10 adulte und 11 neugeborene Tiere zur Verfügung. Die adulten Nestin-GFP-Mäuse wurden perfusionsfixiert. Anschließend wurden die Lungen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) für 4 Stunden postfixiert und dann in 30% Sucrose in PBS über Nacht bei 4°C platziert.

Den neugeborenen Nestin-GFP-Mäusen wurde wenige Stunden nach der Geburt CO₂ zugeführt, anschließend wurden sie für 7 Stunden in toto mit 4% PFA immersionsfixiert und dann in 30% Sucrose in PBS bei 4°C gesetzt.

Lungengewebe von C57BL/6NHsd-Mäusen von der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) wurde für die Western-Blot-Untersuchungen genutzt.

Im Western Blot diente als positive Kontrolle der Nestin-Expression Hodengewebe von EDS-behandelten Ratten (Genehmigung durch Ethikkommission in Hamburg, G8151/591-00.33). Die Injektion von EDS sorgt initial für die Elimination der existierenden Leydig-Zell-Population mit einer folgenden kompletten Leydig-Zell-Regeneration (Davidoff et al. 2004).

3.1.2 Antikörper

3.1.2.1 Primärantikörper in der Immunfluoreszenz

Nestin-AK:

- Firma: Milipore (Schwalbach, Deutschland), vormals Chemicon International
- Monoklonal, aus Maus (Clone R401)
- Verdünnung: 1:100 in PBS

CD31-AK:

- Firma: BD Pharmingen (Heidelberg, Deutschland)
- Biotin gekoppelt, aus Ratte
- Verdünnung: 1:500 in PBS

SMA-AK:

- Firma: Serotec (Oxford, Großbritannien)
- Monoklonal, aus Maus
- Verdünnung: 1:500 in PBS

3.1.2.2 Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz

Bei monoklonalem (Maus-)Erstantikörper ohne Biotin-Kopplung (Nestin-AK und SMA-AK):

Cy3-Ziege-anti-Maus-IgG:

- Firma: Jackson Immuno Research (Dianova) (Hamburg, Deutschland)
- Verdünnung: 1:500 in PBS

Bei Biotin-gekoppeltem Primärantikörper (CD31):

Cy3-Streptavidin:

- Firma: Jackson Immuno Research (Dianova)
- Verdünnung: 1:5.000 in PBS

3.1.2.3 Primärantikörper im Western Blot

Nestin-AK:

- Firma: Millipore, vormals Chemicon International
- Monoklonal, aus Maus (Clone R401)
- Verdünnung: 1:1.000 in PBS

3.1.2.4 Sekundärantikörper im Western Blot

Bei monoklonalem Primärantikörper:

Ziege-anti-Maus-IgG:

- Firma: Pierce (Rockford, Illinois, USA)
- Verdünnung: 1:2.000 in PBS

3.2 Methoden

3.2.1 Immunfluoreszenz

3.2.1.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- Super Frost Plus-Objektträger (R. Langenbrinck, Labor-und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland)
- Normalseren verschiedener Spezies: 2% Schweineserum in PBS bei Biotin-gekoppeltem Erstantikörper, 2% Ziegenserum in PBS bei monoklonalem (Maus-)Erstantikörper
- Primärantikörper (s.o. 3.1.2.1)
- PBS: 0,136M NaCl; 0,05M Na₂HPO₄; mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
- Sekundärantikörper (s.o. 3.1.2.2)
- DAPI (Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland)
- 4% PFA-Lösung (in PBS)
- Eindeckungsmedium PBS+Glycerol (1:3)

3.2.1.2 Durchführung

Von dem in PFA fixierten Gewebe wurden mit Hilfe eines Kryostats (Leica) 10µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgelegt und bei Raumtemperatur eine Stunde lang getrocknet. Zum Schutz der Fluoreszenz des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde bei der Durchführung des Versuches darauf geachtet, dass die Lichtexposition des Gewebes bzw. der Schnitte möglichst gering gehalten wurde. Im Folgenden ist der weitere Ablauf schematisch dargestellt. Alle Inkubationen wurden in einer „feuchten Kammer“ durchgeführt.

- Blockierung für 60 Minuten mit 2% Normalserum (s.o. 3.2.1.1.) in PBS bei Raumtemperatur
- Zugabe des in PBS verdünnten Primärantikörpers (s.o. 3.1.2.1.), Inkubation bei 4°C über Nacht
- Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
- Inkubation mit dem in PBS verdünnten Sekundärantikörper (s.o. 3.1.2.2.) für 60 Minuten

- Spülen in PBS für 2x 10 Minuten
- Postfixierung mit PFA für 10 Minuten
- Eindeckung in PBS+Glycerol (1:3)
- Lagerung der Schnitte bei 4°C

Anschließend wurden Bilder mit einem Zeiss Axioskop 2 Mikroskop (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und einem konfokalen Laserrastermikroskop (CLSM, Leica TCS SP2 AOBS, Leica, Mannheim, Deutschland) angefertigt. Als Kontrollen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Schnitte anstelle des Primärantikörpers nur mit der Antikörperpufferlösung inkubiert.

3.2.2 Proteinpräparation aus Geweben

3.2.2.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- Homogenisierungspuffer „HOPU“: 50 mM Tris-HCl [pH 7,5]; 1mM EDTA; 1 mM Dithiothreitol [DTT] und 0,1 mM PMSF
- 50mM Tris-Puffer [pH 7,5]

3.2.2.2 Durchführung

In flüssigem Stickstoff eingefrorene Stücke der Lunge von Mäusen wurden in einem Mörser pulverisiert und dann zusammen mit dem Homogenisierungspuffer in einem sog. Douncer mechanisch homogenisiert. Nicht homogenisierte Zelltrümmer sowie Zellkerne wurden durch Sedimentation während einer Zentrifugation (8min bei 3.000g) bei 4°C entfernt. Der Überstand dieser Präparation wurde als Homogenat eingesetzt.

Zur weiteren Auftrennung in Membran- und Zytosolanteile wurde der Überstand für 30 Minuten bei 100.000g und der Temperatur von 4°C zentrifugiert. Der zytosolische Überstand wurde abpipettiert und eingefroren. Die partikuläre Fraktion wurde nun in 50mM Tris-Puffer (pH 7,5) resuspendiert. Dann erfolgten das Einfrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei -70°C.

3.2.3 Western Blot

3.2.3.1 Verwendete Reagenzien, Puffer und Lösungen

- 30% Acrylamid: 150g Acrylamid; 4g Bisacrylamid in 500ml Aqua dest. lösen; 29:1
- 4x Trenngelpuffer: 0,375M Tris-HCl [pH 8,8]; 0,1% (w/v) SDS
- 4x Sammelgelpuffer: 0,5M Tris-HCl [pH 6,8]; 0,1% (w/v) SDS
- 10% Ammoniumpersulfat (APS) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TEMED (Roth)
- Trenngel 7%: 15ml Trenngelpuffer (4x); 14ml 30% Acrylamid; ad 60ml mit Aqua dest. +250µl 10% APS+50µl TEMED
- Sammelgel: 5ml Sammelgelpuffer (4x); 2,6 ml 30% Acrylamid; ad 20ml mit Aqua dest. +100µl 10% APS + 25µl TEMED
- 3x Stopp-Mix: 0,375M Tris-HCl [pH 6,8]; 0,2M DTT; 15% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0,6mg/dl Bromphenolblau
- Molekulargewichtsmarker (Sigma Saint Louis, Missouri, USA)
- PAGE-Puffer: 0,025M Tris-HCl [pH 8,4]; 0,192M Glycin; 0,1% (w/v) SDS
- Transferpuffer: 100mM Tris; 193mM Glycin
- 10x TBS: 200mM Tris; 1,37M NaCl [pH 7,6]
- 1x TBST: 1.000ml TBS + 500µl Tween 20 (0,05% Tween 20)
- Blockierungspuffer: 1% Roche-Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics GmbH) in 0,1M Malinsäure + 0,15M NaCl [pH 7,5]
- 0,1% Ponceau-S (w/v) (Sigma) in 5% Essigsäure
- Blotmembranen: Nitrozellulose (GE Healthcare, 0,2µm, München, Deutschland)
- Blottingpapier: Chromatographie-Papier (Whatman, Dassel, Deutschland)
- Antikörper-Inkubationspuffer: 90% TBST; 10% Blockierungspuffer; 0,005% Thimerosal
- Primärantikörper (s.o. 3.1.2.3)
- Sekundärantikörper (s.o. 3.1.2.4)

- Chemilumineszenz-Reagenzien (ECL Western Blotting Detection Reagents) (GE Healthcare)
- Röntgenfilme (Fujifilm Medical, Düsseldorf, Deutschland)

3.2.3.2 Durchführung

Von den gewonnenen zytosolischen Proteinfractionen wurden jeweils 75µg Lungengewebe bzw. 80µg Hodengewebe mit 3x Stopp-Mix im Verhältnis 2:1 gemischt und für 2 Minuten bei 100°C im Heizblock denaturiert. Verwendet wurde für alle Western-Blot-Untersuchungen das Elektrophoresesystem SE 600 der Firma Hoefer Scientific Instruments (Holliston, Massachusetts, USA) (Spannungsquelle Hoefer, PS 500XT-230V). Nach dem Auftragen der Proben erfolgte eine Elektrophorese in der mit PAGE-Puffer gefüllten Kammer (TE 42, Hoefer) bei 13W für circa 1h, bis die Lauffront das ca. 4cm breite Sammelgel durchwandert hatte. Die Auftrennung im Trenngel wurde mit einer Laufzeit von circa 2h bei 17W durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 0,6A über Nacht bei 4°C auf Nitrozellulose transferiert. Im Folgenden ist die Behandlung der Membranen nach erfolgtem Transfer schematisch dargestellt.

- 10 Minuten Färbung in Ponceau-Rot zur Überprüfung gleicher Proteinmengen der verwendeten Proben und der Identifikation des Längenstandards
- Spülen in Aqua dest.
- 2 Stunden Blockieren in Blockierungspuffer
- 5 Minuten spülen in TBST
- 1 Stunde Inkubation mit dem Primärantikörper (s.o. 3.1.2.3.), verdünnt mit Antikörper-Inkubationspuffer
- 3x 5 Minuten Spülen in TBST
- 1 Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper (s.o. 3.1.2.4.)
- 2x 5 Minuten und anschließend 90 Minuten Spülen in TBST
- Spülen in Aqua dest.
- Detektion (in der Dunkelkammer mit Substratlösung für Peroxidase gemäß Vorschrift des Herstellers)

4 Ergebnisse

4.1 Nestin-GFP-Expression in den Gefäßwänden der Lunge

Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Lokalisation des Proteins Nestin in der Lunge zu bestimmen. Dazu wurden Lungen von neugeborenen (postnatal Tag 1 = d1) und adulten (ad) transgenen Nestin-GFP-Mäusen untersucht.

Bei der Beobachtung der Lungen auf Nestin-GFP-Expression können zahlreiche Nestin-exprimierende Zellen in der Lunge identifiziert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass Gefäßwände in der Lunge ein Nestin-GFP-Signal aufweisen (Abb. 3, siehe G). Bronchiale Strukturen zeigen dagegen in keinem Fall Nestin-GFP-positive Zellen (Abb. 3, siehe B). Unter den Nestin-GFP-positiven Gefäßen (Abb. 4a) befinden sich auch Kapillaren (Abb. 4b). Bei den Nestin-GFP-exprimierenden Zellen ist, wie bereits beschrieben (Mignone et al. 2004), neben dem Zytoplasma regelmäßig auch der Zellkern markiert (Abb. 4b).

Es zeigte sich also eine Assoziation von Nestin-GFP-Expression zu Gefäßwänden. Nestin-GFP-exprimierende Zellen befanden sich in Wänden von Gefäßen mit größerem und kleinerem Durchmesser. Bronchialwände dagegen wiesen keine Nestin-GFP-exprimierende Zellen auf.

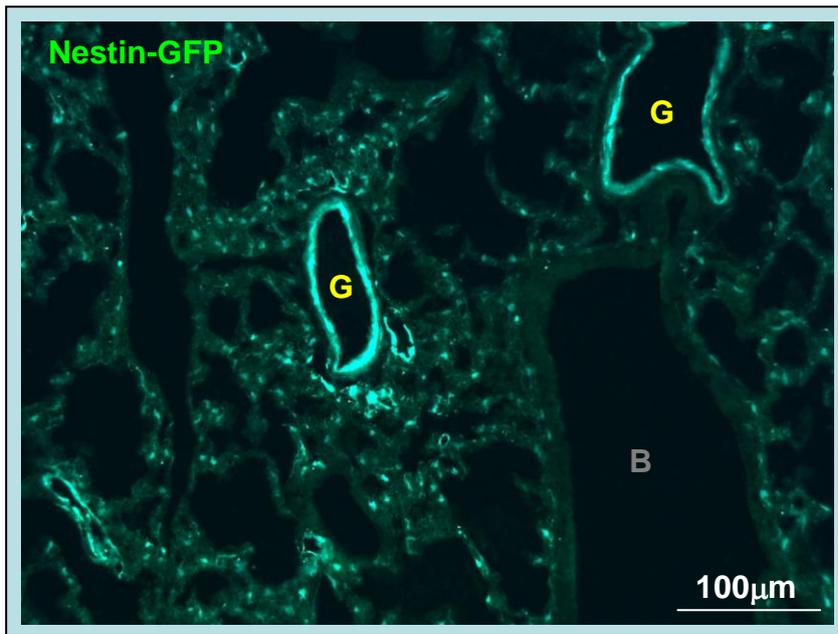


Abb. 3: Lokalisation von Nestin-GFP in Gefäßwänden der Lunge von transgenen Nestin-GFP-Mäusen (Nestin-GFP-Maus, d1); Wände von größeren Gefäßen (G) der Lunge sind Nestin-GFP positiv; bronchiale Strukturen (B) zeigen kein Nestin-GFP-Signal

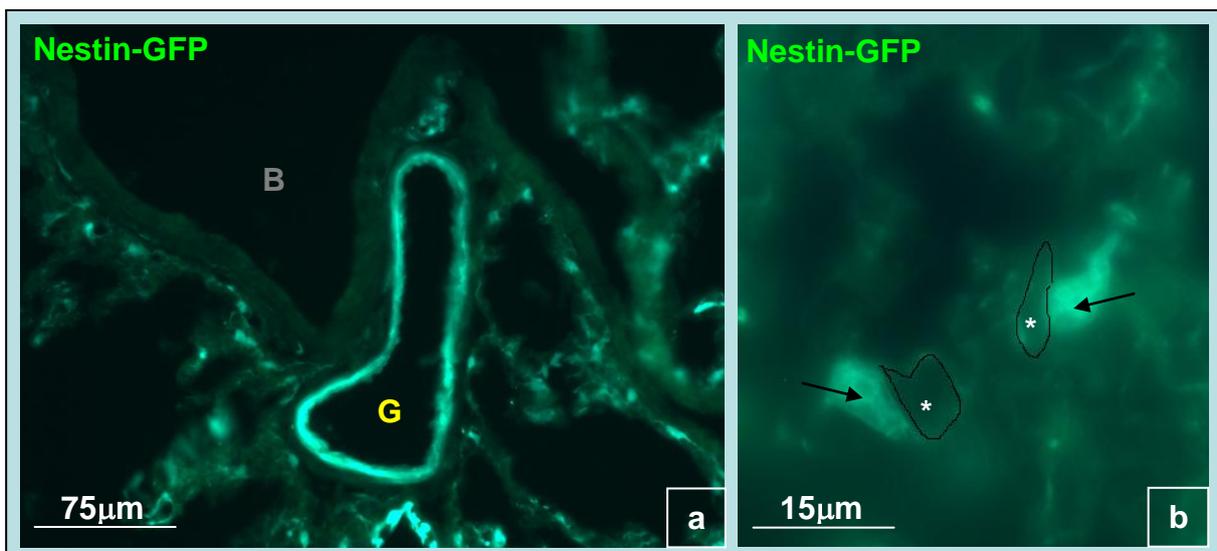


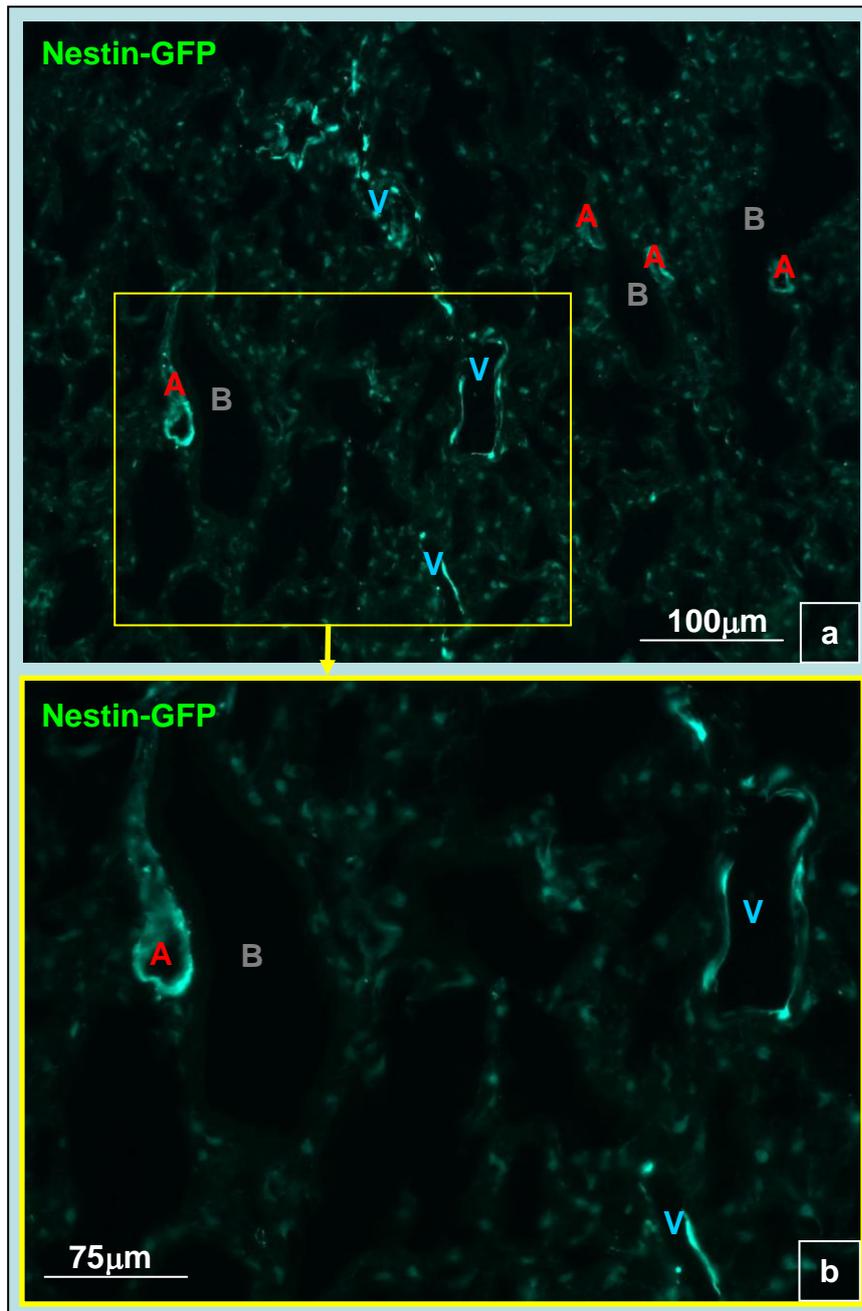
Abb. 4: Lokalisation von Nestin-GFP in Gefäßwänden verschiedener Größen:
a: Nestin-GFP-positive Zellen in der Wand eines größeren Gefäßes (G) (Nestin-GFP-Maus, d1); Wand des Bronchiolus ist Nestin-GFP negativ (B)
b: Nestin-GFP in Kapillaren der Lunge (Nestin-GFP-Maus, ad); das Lumen (*) der Kapillaren ist nachgezeichnet; Pfeil: Kern ist Nestin-GFP markiert

4.2 Nestin-GFP-Expression in allen Gefäßabschnitten in der Lunge

Um zu differenzieren, in welchen Gefäßabschnitten der Lunge Nestin-Expression vorkommt, wurden verschiedene Gefäßabschnitte, nämlich Venen, Arterien und Kapillaren auf das Vorhandensein von Nestin untersucht.

Sämtliche untersuchte Gefäßabschnitte der Lunge zeigen sich positiv für Nestin-GFP. In arteriellen und venösen Gefäßwänden finden sich Nestin-GFP-exprimierende Zellen (Abb. 5, siehe A und V). Dabei liegen Arterien stets benachbart zu bronchialen Strukturen (Abb. 5, Abb. 6a, siehe A und B). Venen weisen eine dünnere Wandschicht auf und sind unabhängig von der Nähe zu Bronchioli lokalisiert (Abb. 5, Abb. 6b, siehe V).

Nestin-GFP-Expression fand sich in Wänden von Gefäßen verschiedener Größe; sowohl in arteriellen und venösen Gefäßen unterschiedlichen Durchmessers (Abb. 5-Abb. 7) als auch in Kapillaren ließen sich Nestin-GFP-positive Zellen darstellen (Abb. 7). Somit war Nestin-GFP-Expression in allen Gefäßabschnitten der Lunge aufzufinden.



**Abb. 5: Lokalisation von Nestin-GFP in verschiedenen Gefäßabschnitten (Nestin-GFP-Maus, d1):
a und b: Nestin-GFP-exprimierende Zellen in arteriellen (A) und in venösen (V) Gefäßen; Bronchioli (B) sind Nestin-GFP negativ**

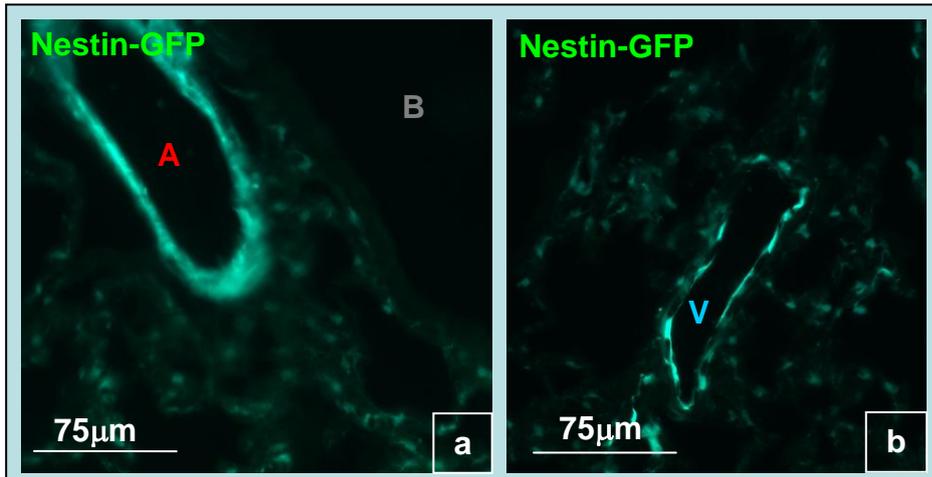


Abb. 6: Lokalisation von Nestin-GFP in Arterie und Vene (Nestin-GFP-Maus, d1):
a: Nestin-GFP-positive Arterie (A) benachbart zum Nestin-GFP-negativen Bronchiolus (B)
b: Nestin-GFP-positive Vene (V) ohne Nähe zu bronchialen Strukturen; Nestin-GFP-positive Vene besitzt eine dünnere Wand als die Nestin-GFP-positive Arterie (siehe A in 6 a)

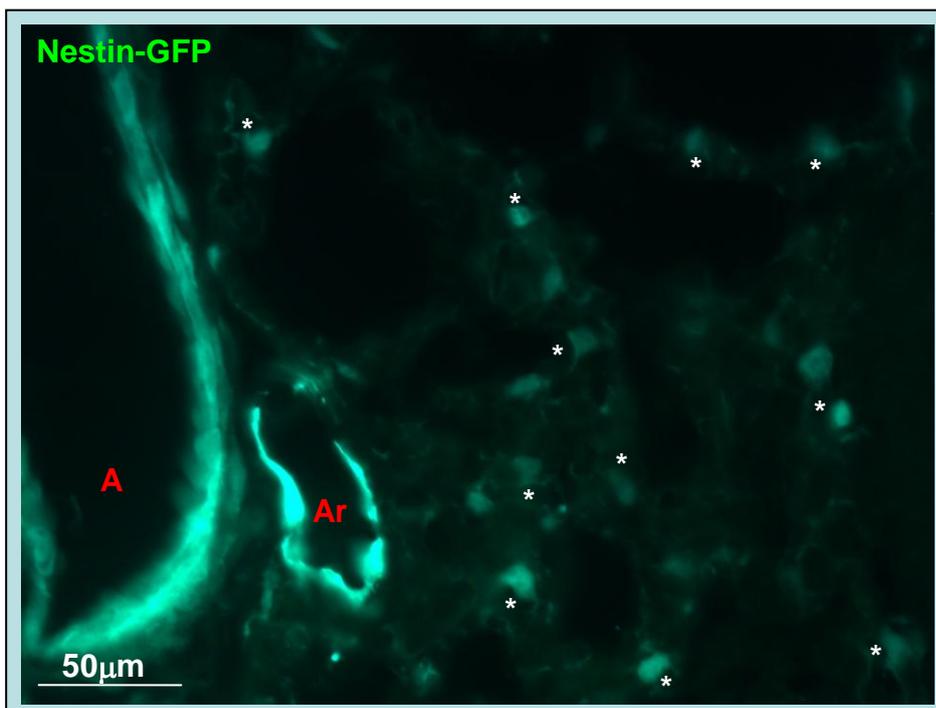


Abb. 7: Lokalisation von Nestin-GFP in Gefäßen unterschiedlicher Größe (Nestin-GFP-Maus, d1); Nestin-GFP-exprimierende Zellen in Wänden einer Arterie (A), einer Arteriole (Ar) und von Kapillaren (*)

4.3 Nestin-GFP-Lokalisation innerhalb der Gefäßwände

Die Lokalisation von Nestin-GFP in Gefäßwänden der Lunge ist eindeutig. Bei der Betrachtung der Nestin-GFP-positiven Gefäße stellte sich die Frage nach dem spezifischen Zelltyp der Nestin-Expression.

Schon bei nicht zusätzlich gefärbten Schnitten ist klar zu erkennen, dass Endothelzellen kein Nestin-GFP aufweisen (Abb. 8, siehe E und M). Im Folgenden wurden zur genaueren Beschreibung der Lokalisation von Nestin immunhistochemische Untersuchungen an Lungen von Nestin-GFP-Mäusen mit den Antikörpern CD31 und SMA durchgeführt. Der Antikörper CD31 ist gegen ein Endothelzell-spezifisches Protein (CD31) gerichtet und dient somit zur Darstellung von Endothelzellen. Der verwendete Antikörper SMA färbt ein Protein der glatten Muskelzellen an (α -smooth-muscle-Aktin) und führt zur Identifikation von glatten Gefäßmuskelzellen.

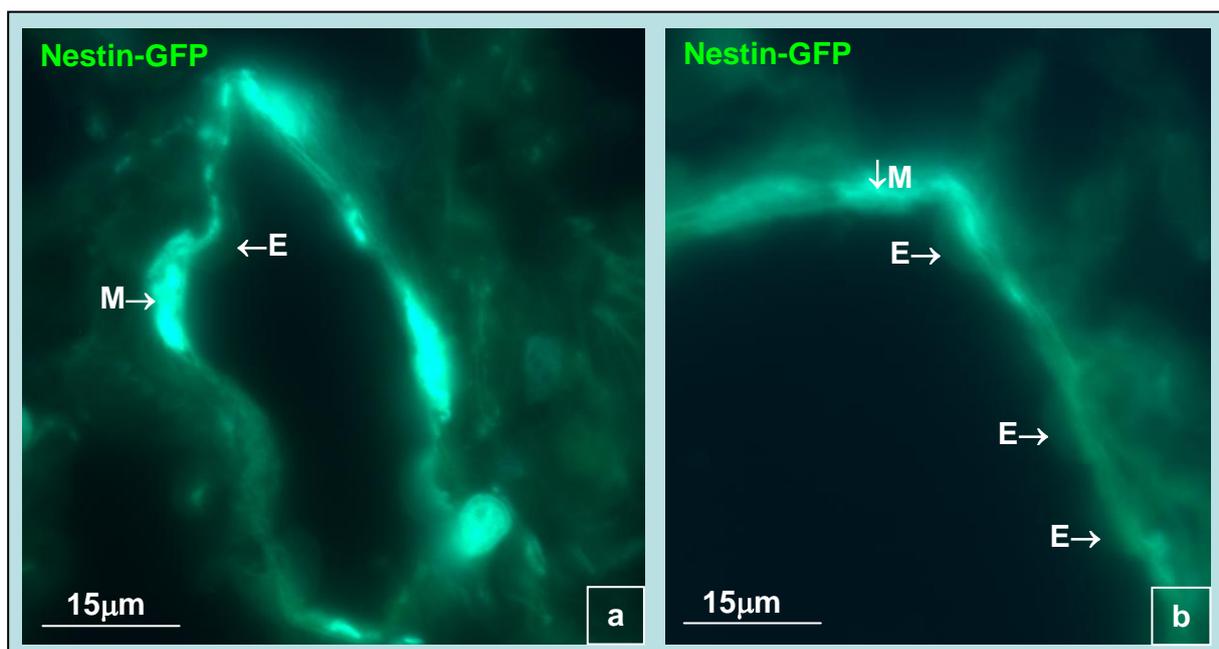


Abb. 8: Lokalisation von Nestin-GFP in glatten Gefäßmuskelzellen (Nestin-GFP-Maus, ad):
a und b: glatte Gefäßmuskelzellen (M) sind Nestin-GFP positiv; Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ

4.3.1 Nestin-GFP-Expression in Wänden größerer Gefäße (Arterien, Arteriolen, Venen)

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen zur Bestimmung der Nestin-Lokalisation wurden Gefäße mit glatter Muskulatur („größere Gefäße“) und Gefäße ohne glatte Muskulatur (Kapillaren, „kleinere Gefäße“) separat betrachtet. Es wurde kein Unterschied in der Lokalisation von Nestin-GFP in den Lungen von neugeborenen und adulten Mäusen gefunden.

4.3.1.1 Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 in größeren Gefäßen

Zunächst erfolgten immunhistochemische Untersuchungen mit dem Endothelzellmarker CD31, um zu zeigen, dass Nestin-GFP und CD31 nicht kolokalisiert sind.

Die Abb. 9 stellt eine Übersichtsaufnahme von Gefäßen und Bronchioli in der Lunge von Nestin-GFP-Mäusen dar. Sie zeigt eine Nestin-GFP-positive Arterie, die von vier Nestin-GFP-negativen Bronchioli umgeben ist (Abb. 9a-c). Eindeutig erkennbar ist, dass die in Abb. 9f dargestellte Nestin-GFP-exprimierende Zelle sich jenseits der CD31-positiven, Nestin-GFP-negativen Zellen befindet. Bei den CD31-positiven Zellen handelt es sich um Endothelzellen (Abb. 9d-f, siehe E) und bei der Nestin-GFP-markierten Zelle um eine glatte Gefäßmuskulaturzelle (Abb. 9d-f, siehe M).

Die Expressionen von CD31 und Nestin-GFP von unterschiedlichen Zelltypen ist klar in Abb. 10 erkennbar. Es wird deutlich dargestellt, dass die CD31-positiven Endothelzellen nicht gleichzeitig die Nestin-GFP-exprimierenden Zellen sind (Abb. 10). Die Kerne der Endothelzellen, die in das Lumen des Gefäßes hineinragen, sind in dieser Abbildung als Aussparung sichtbar (Abb. 10, siehe E1, E3, E4). Die Nestin-GFP-exprimierenden glatten Gefäßmuskulaturzellen befinden sich lumenfern von den Endothelzellen (Abb. 10, siehe M1 und E1, M2 und E2).

In den Gefäßwänden von Arterien ist klar zu erkennen, dass die Muskelschicht Nestin-GFP markiert ist. Die CD31-angefärbte Endothelschicht präsentiert keine Nestin-GFP-markierten Zellen (Abb. 11, Abb. 12).

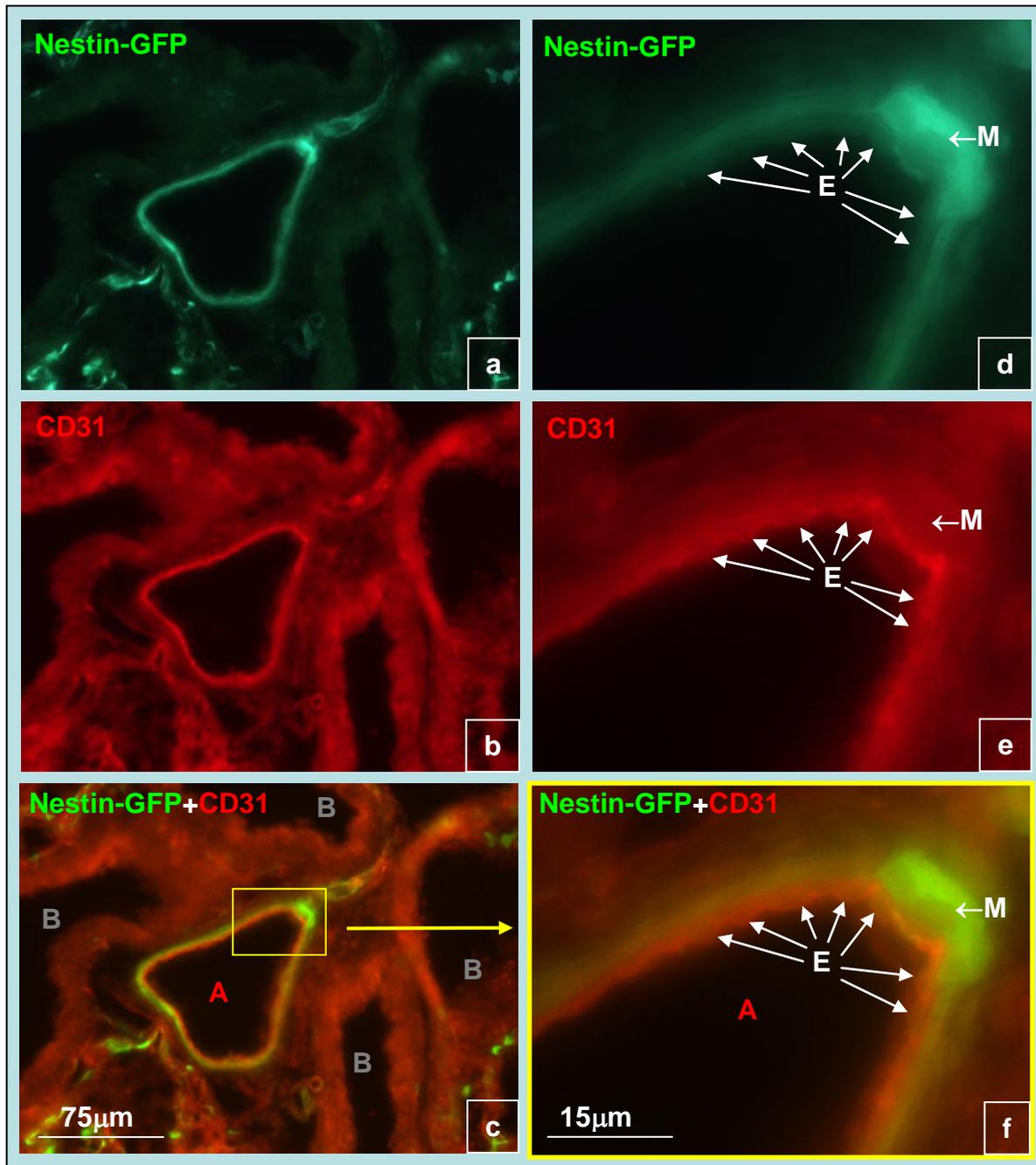


Abb. 9: fehlende Kollokalisierung von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 (Nestin-GFP-Maus, d1):
 a-c: Übersichtsaufnahme von Gefäßen und Bronchioli in der Lunge; Nestin-GFP-positive Arterie (A), benachbart vier Nestin-GFP-negative Bronchioli (B)
 d-f: glatte Gefäßmuskulatur (M) ist Nestin-GFP positiv; Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ

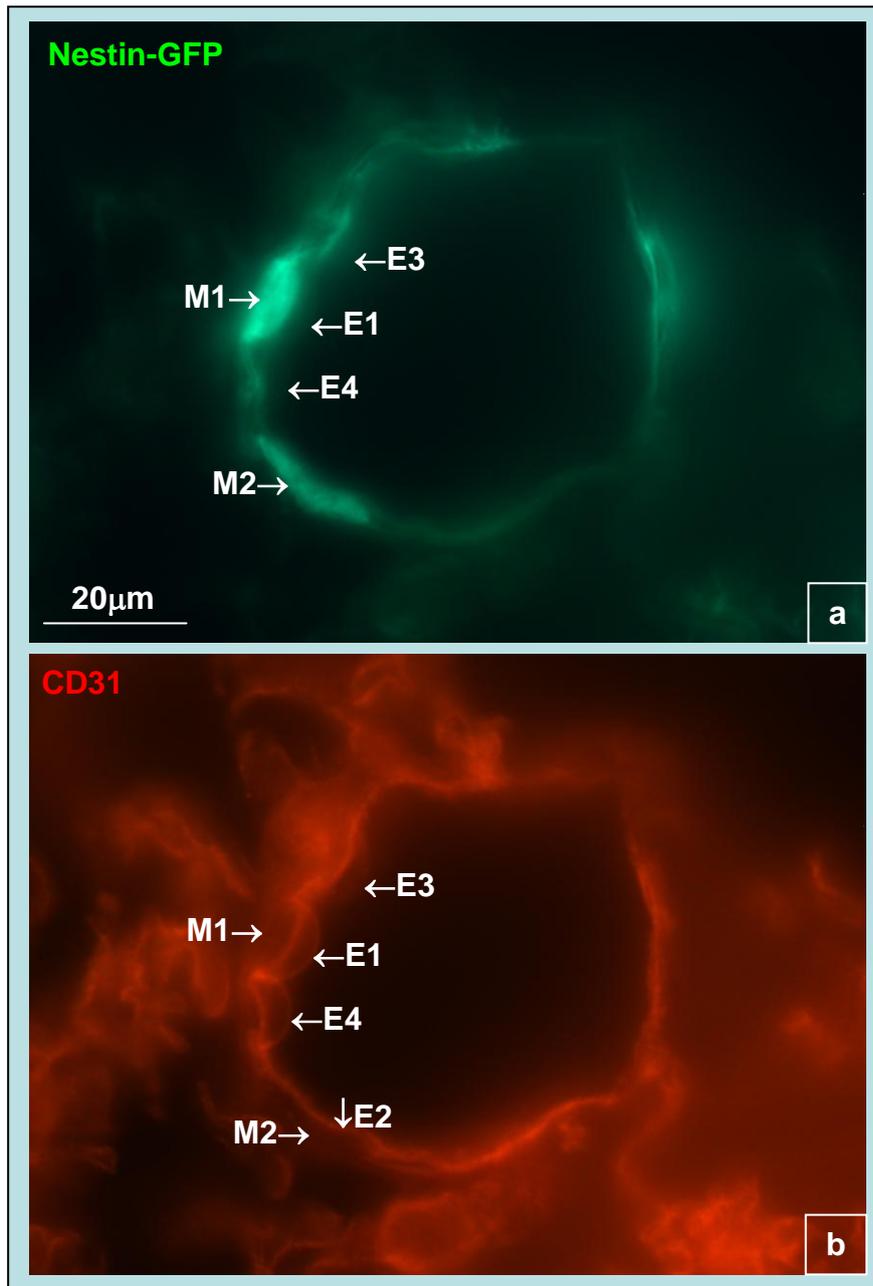


Abb. 10: fehlende Kolo-kalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 (Nestin-GFP-Maus, ad); glatte Gefäßmuskelzellen (M) sind Nestin-GFP positiv; Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ:

a und b: Nestin-GFP-exprimierende glatte Gefäßmuskelzellen befinden sich lumenfern von Endothelzellen (M1 ist lumenfern von E1, E3, E4, M2 ist lumenfern von E2)

b: Endothelzellen ragen in das Lumen des Gefäßes; Kerne sind ausgespart (E1, E3, E4)

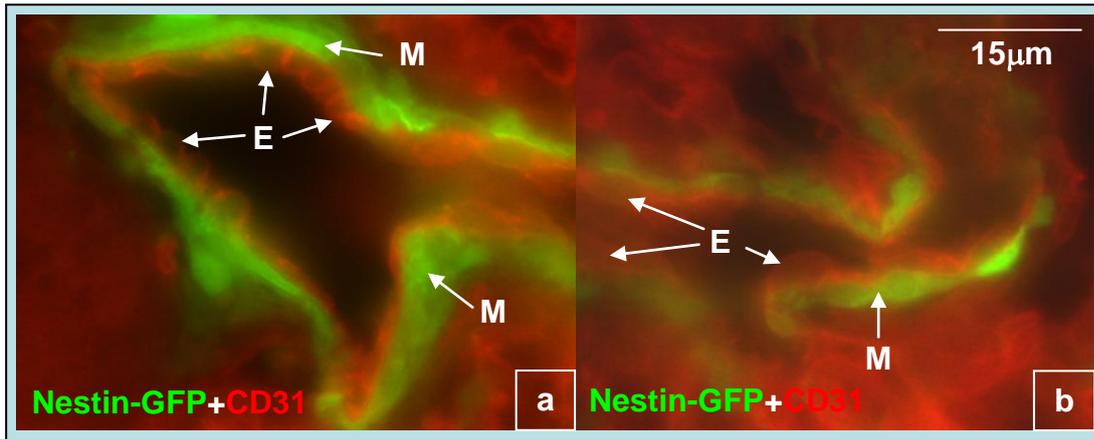


Abb. 11: fehlende Kolkalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Arterie (Nestin-GFP-Maus, d1):

a und b: Muskelschicht (M) ist Nestin-GFP markiert; die CD31-angefärbte Endothelzellschicht (E) zeigt keine Nestin-GFP-positiven Zellen

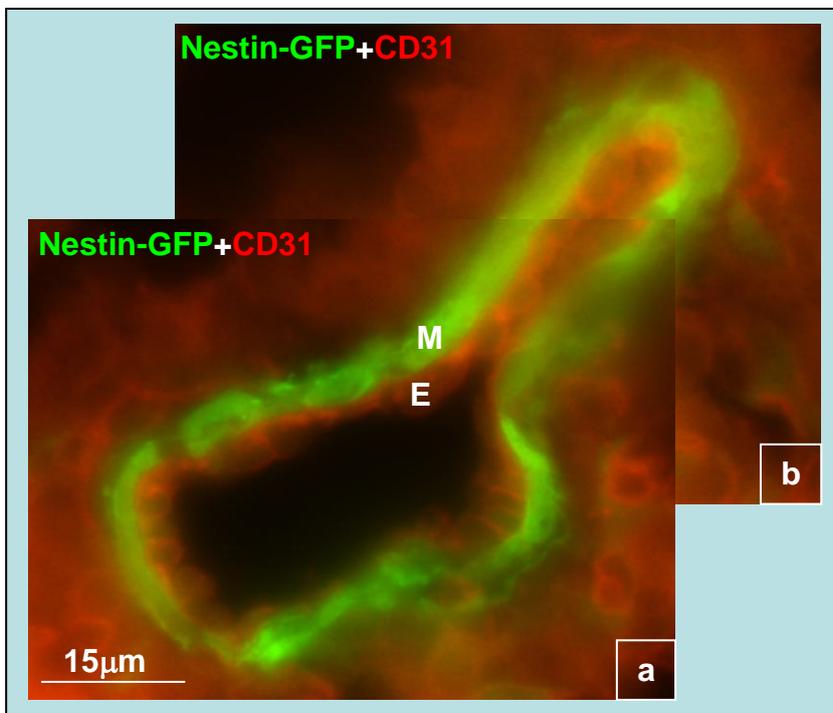


Abb. 12: fehlende Kolkalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Arterie (Nestin-GFP-Maus, d1):

a und b: Muskelschicht ist Nestin-GFP (M) markiert; die CD31-angefärbte Endothelzellschicht (E) zeigt keine Nestin-GFP-positiven Zellen

Ebenfalls in den Arteriolen handelt es sich bei den markierten Zellen mit CD31 und Nestin-GFP nicht um dieselbe Zelle (Abb. 13, Abb. 14). Die Endothelzellen sind nicht diejenigen Zellen, die Nestin-GFP exprimieren (Abb. 13, siehe E). Zum einen ist auf diesen Bildern zu erkennen, dass Nestin-GFP den Kern (Mignone et al. 2004) der glatten Gefäßmuskelzelle markiert (Abb. 14b,d, siehe M), zum anderen wird ebenfalls die gestreckte Form der glatten Gefäßmuskelzellen deutlich (Abb. 14a,c,e, siehe M). Zusätzlich ist zu beobachten, dass es sich nicht obligat bei allen glatten Gefäßmuskelzellen um Nestin-GFP-exprimierende Zellen handelt. Es finden sich Arteriolen-Anschnitte, bei denen nur eine einzelne glatte Gefäßmuskelzelle ein Nestin-GFP-Signal zeigt (Abb. 14a,b), d.h. die Nestin-GFP-positiven Zellen stellen eine Subpopulation der glatten Gefäßmuskelzellen dar.

Angefertigte Bilder mit einem konfokalen Mikroskop verdeutlichen die unterschiedliche Lokalisation von Nestin-GFP und CD31 durch die eindeutige Trennung zwischen CD31-angefärbter Endothelzellschicht und Nestin-GFP-markierter Muskelschicht (Abb. 15, Abb. 16, siehe 1).

Eine Übersichtsaufnahme mit der Kernfärbung DAPI bestätigt die beobachtete Assoziation von Nestin-GFP zu Gefäßen (Abb. 17a-d). Klar sind die Nestin-GFP-positiven Arterien und der dazu im Gegensatz stehende Nestin-GFP-unmarkierte Bronchiolus zu erkennen (Abb. 17a-d, siehe A und B). Die Färbung mit DAPI stellt deutlich sowohl den Kern der Endothelzelle (Abb. 17g, siehe E) als auch den der glatten Gefäßmuskelzelle dar (Abb. 17g, siehe M) und zeigt somit die Expressionen von CD31 und Nestin-GFP in unterschiedlichen Zellen.

Durch den Gebrauch des Endothelzellmarkers CD31 konnte eine Kolo-kalisation von CD31 und Nestin-GFP in der Mehrzahl der untersuchten Schnitte eindeutig ausgeschlossen werden (Abb. 9-Abb. 17). Aufgrund dieser Erkenntnis ist in der Regel nicht von einer endothelialen Lokalisation von Nestin auszugehen.

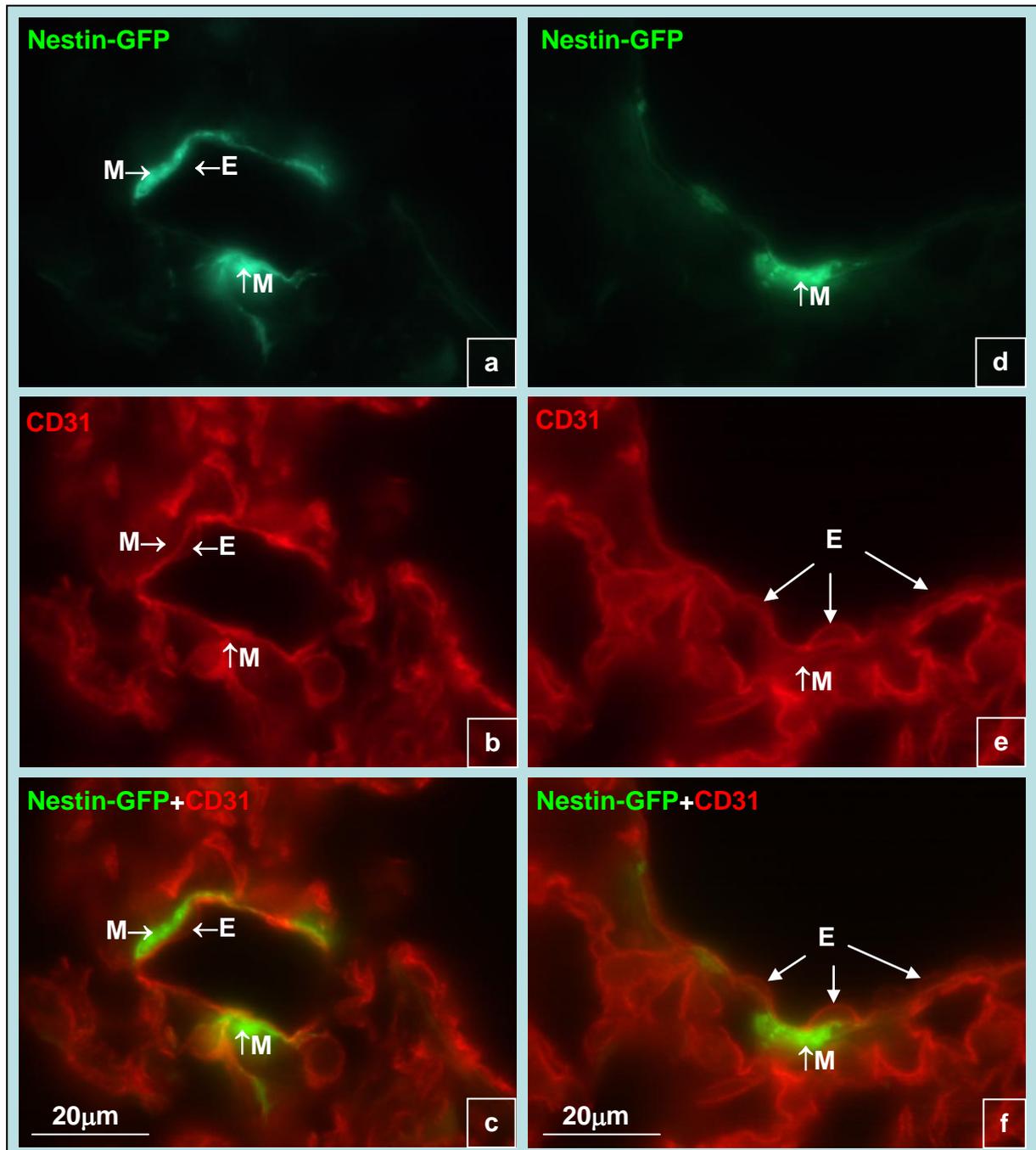


Abb. 13: fehlende Kolorisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Arteriole (Nestin-GFP-Maus, ad):

a-f: glatte Gefäßmuskelzellen (M) sind Nestin-GFP positiv; CD31-positive Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ

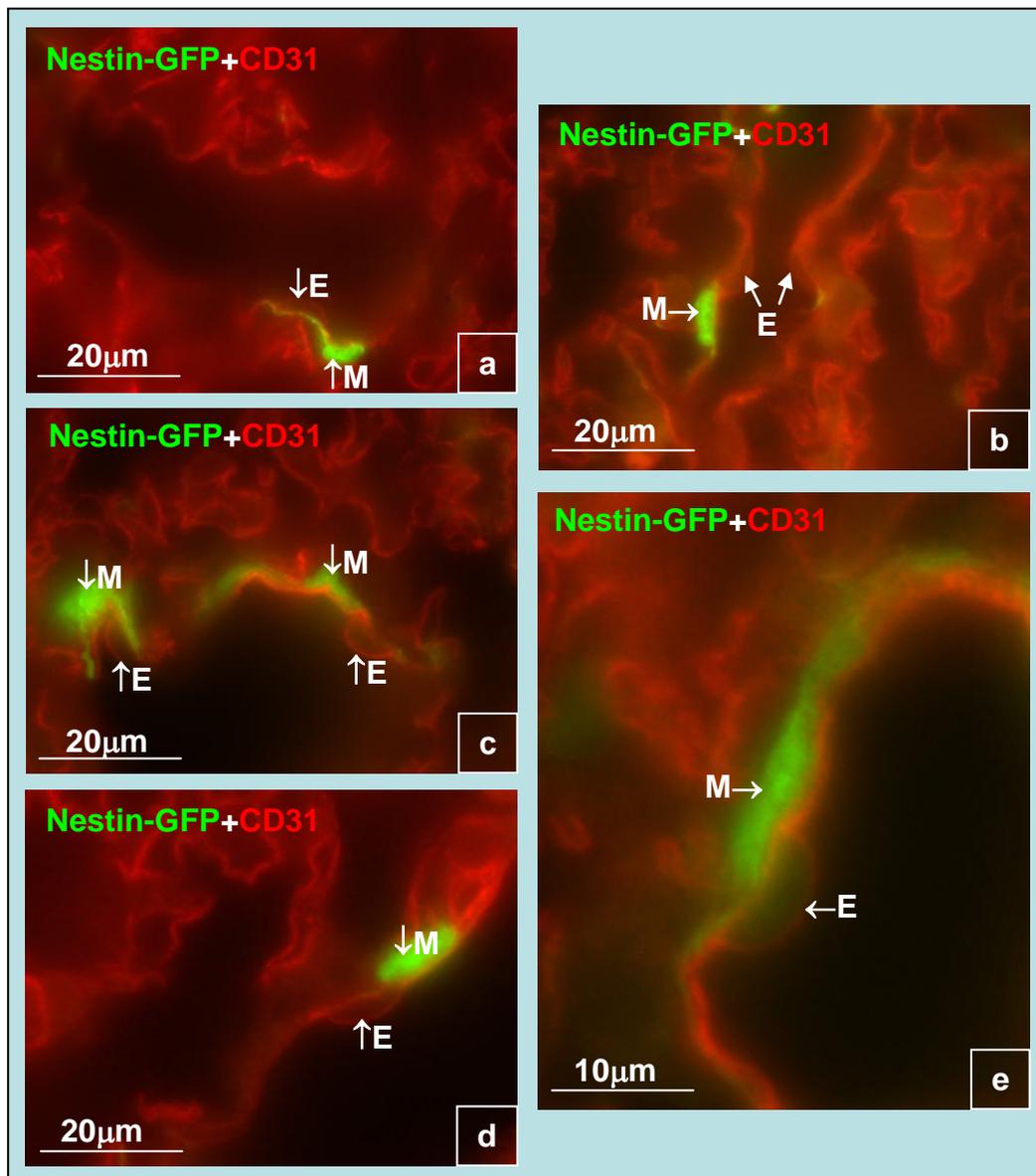


Abb. 14: fehlende Kollokalisierung von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Arteriole (Nestin-GFP-Maus, ad):

a,b: nur vereinzelt sind glatte Gefäßmuskelzellen Nestin-GFP positiv, d.h. Nestin-GFP-positive Zellen stellen eine Subpopulation der glatten Gefäßmuskelzellen dar

a,c,e: glatte Gefäßmuskelzellen (M) mit typisch lang gestreckter Form sind Nestin-GFP positiv; Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ

b,d: Nestin-GFP markiert die Kerne der glatten Gefäßmuskelzellen (M); Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ

d: identisch mit Abb. 34f

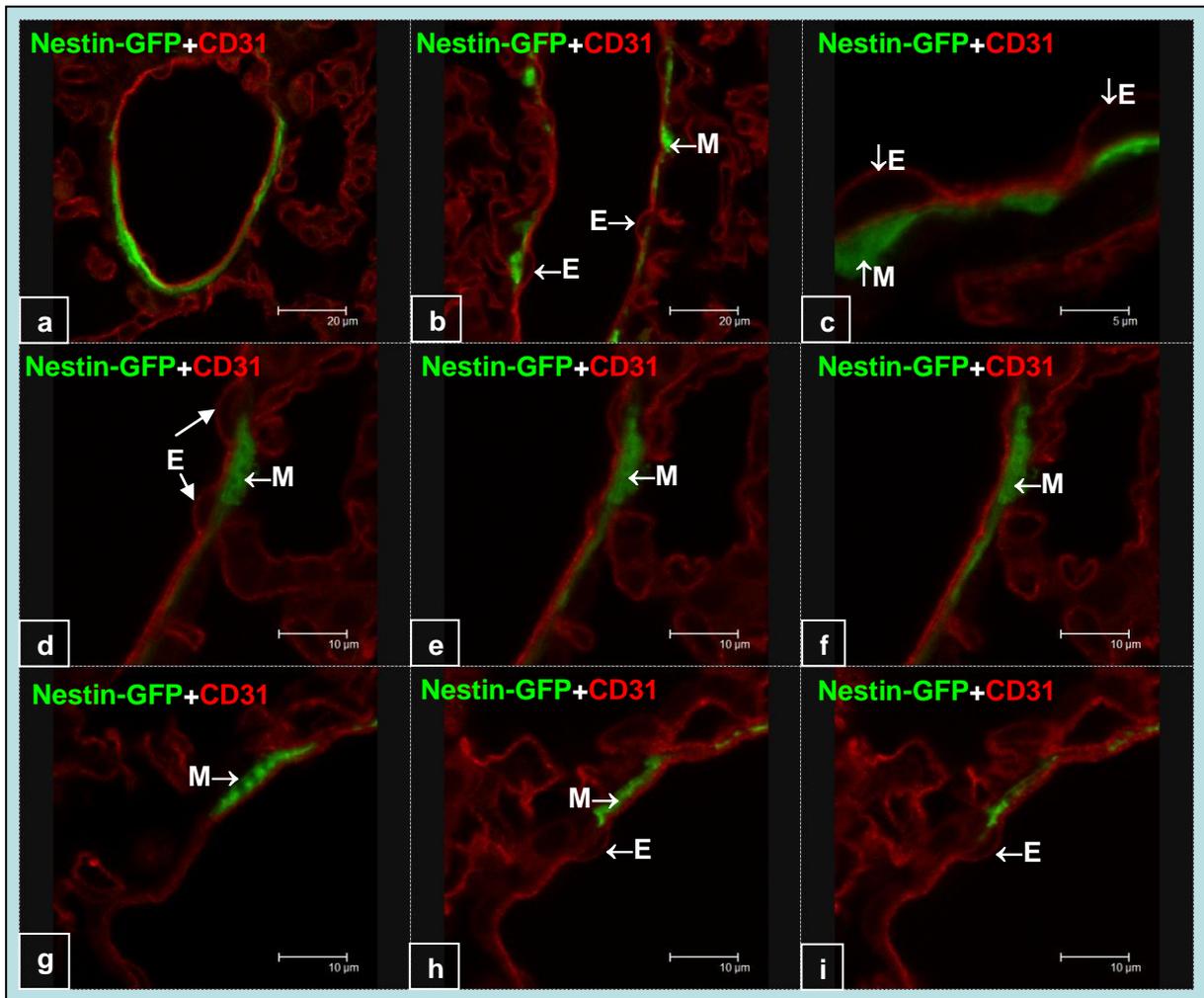


Abb. 15: Fehlende Kolo-kalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 (Konfokales Mikroskop):

a-i: glatte Gefäßmuskelzellen (M) sind Nestin-GFP positiv; CD31-positive Endothelzellen (E) sind Nestin-GFP negativ

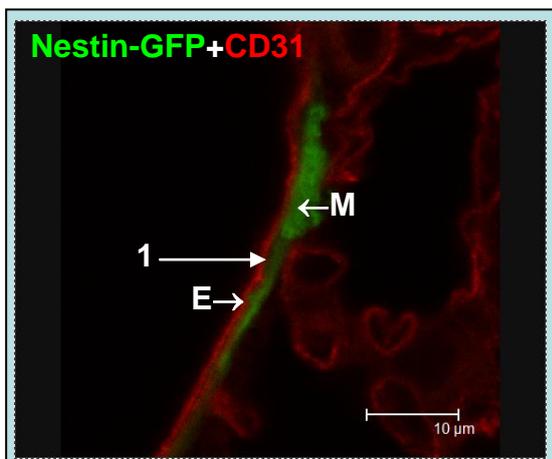


Abb. 16: Fehlende Kolo-kalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 (Konfokales Mikroskop):

1= deutliche Trennung zwischen CD31-positiver Endothelzellschicht (E) und Nestin-GFP-positiver Muskelschicht (M)

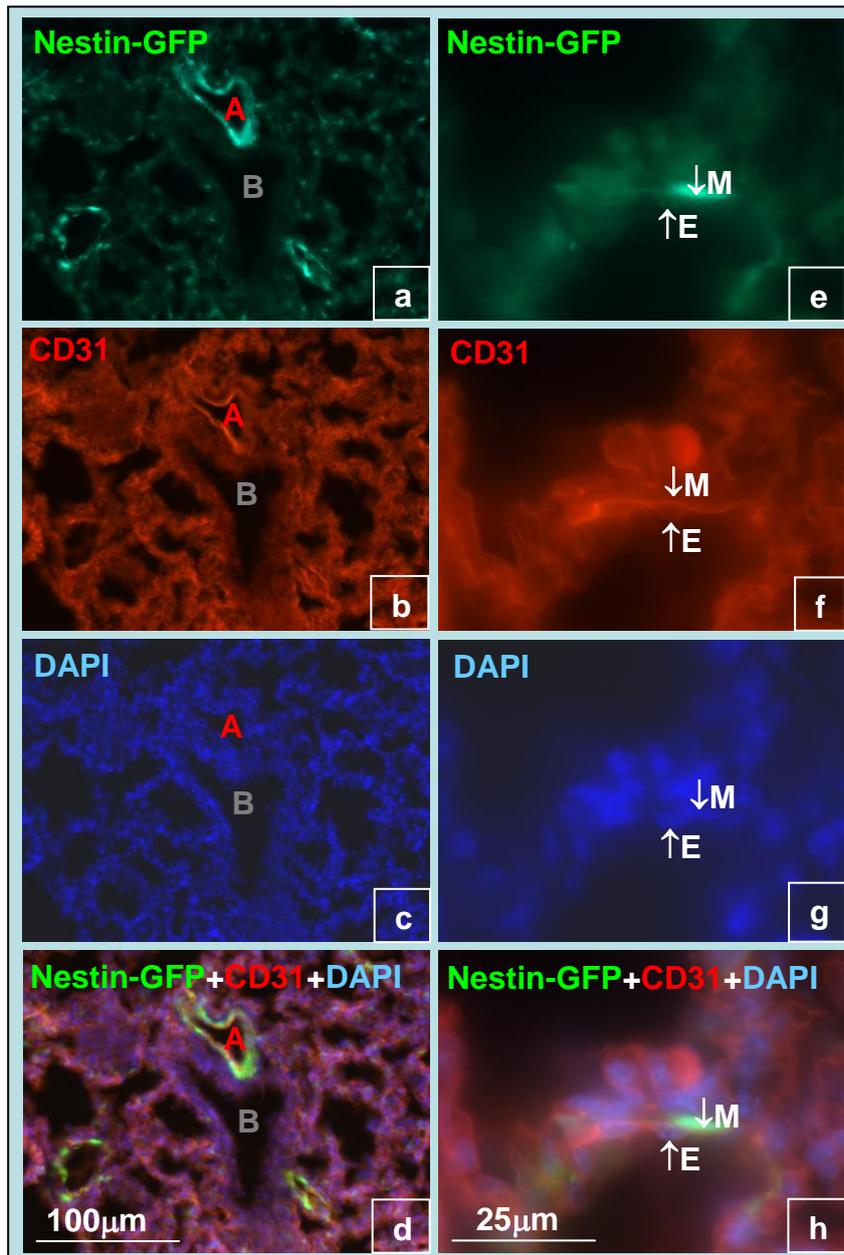


Abb. 17: fehlende Koloalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 (Nestin-GFP-Maus, d1):

a-d: Überblick von Nestin-GFP-positiver Arterie (A), die benachbart zu Nestin-GFP-negativem Bronchiolus (B) ist

e-h: glatte Gefäßmuskulatur (M) ist Nestin-GFP positiv; CD31-positive Endothelzelle (E) ist Nestin-GFP negativ

g: sowohl Kern der glatten Gefäßmuskulatur als auch der Endothelzelle ist dargestellt

c und g: Färbung mit DAPI

4.3.1.2 Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in größeren Gefäßen

Zusätzlich zu den Untersuchungen mit dem Endothelzellmarker CD31 wurden Lungen der Nestin-GFP-Mäuse mit dem Antikörper SMA angefärbt. Der Antikörper SMA ist gegen glatte Muskelzellen gerichtet.

Die Färbungen der Nestin-GFP-Mäuse mit dem Antikörper SMA machen deutlich, dass die Nestin-GFP-markierten Zellen sich positiv für SMA darstellen (Abb. 18-Abb. 24).

Der Antikörper SMA färbt die Nestin-GFP-negativen glatten Muskelzellen der Bronchioli (Abb. 18d, siehe M2) und die Nestin-GFP-positiven glatten Muskelzellen der Gefäße (Abb. 18f, siehe M1) an. Das Nestin-GFP-negative Bronchialepithel (Abb. 18d, siehe BE) und die ebenfalls Nestin-GFP-negativen Muskelzellen des Bronchiolus (Abb. 18d, siehe M2) unterscheiden sich also von den Nestin-GFP-positiven Gefäßwänden (Abb. 18d, siehe A). Somit handelt es sich bei der Nestin-GFP-Expression um eine Gefäß-spezifische Lokalisation. Die gelbe Färbung der Gefäßwand beweist die Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA im Zytoplasma (Abb. 18f).

Viele der SMA-angefärbten glatten Gefäßmuskelzellen sind Zellen, die sich durch eine zusätzliche Nestin-GFP-Expression auszeichnen (Abb. 19). Die SMA-positiven und Nestin-GFP-positiven glatten Gefäßmuskelzellen liegen eindeutig lumenfern der angedeuteten Endothelzellen (Abb. 19, siehe M1 und E1, M3 und E3). Dabei ist zu beachten, dass die Nestin-GFP-Expression mehr im Kern (Mignone et al. 2004) lokalisiert ist, wohingegen die SMA-Färbung im Zytoplasma der Zelle zu finden ist (Abb. 19, siehe M1). Die SMA-markierten glatten Gefäßmuskelzellen weisen ein unterschiedlich starkes Nestin-GFP-Signal auf (Abb. 19a, M1 im Vergleich zu M2 und M3).

Die Abb. 20 und Abb. 21 zeigen die Lokalisation von Nestin-GFP und SMA in denselben Zellen. Es liegt somit eine Kolokalisation vor. Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation von Nestin-GFP auch im Kern (Mignone et al. 2004) und von SMA allein im Zytoplasma wird dargestellt (Abb. 21).

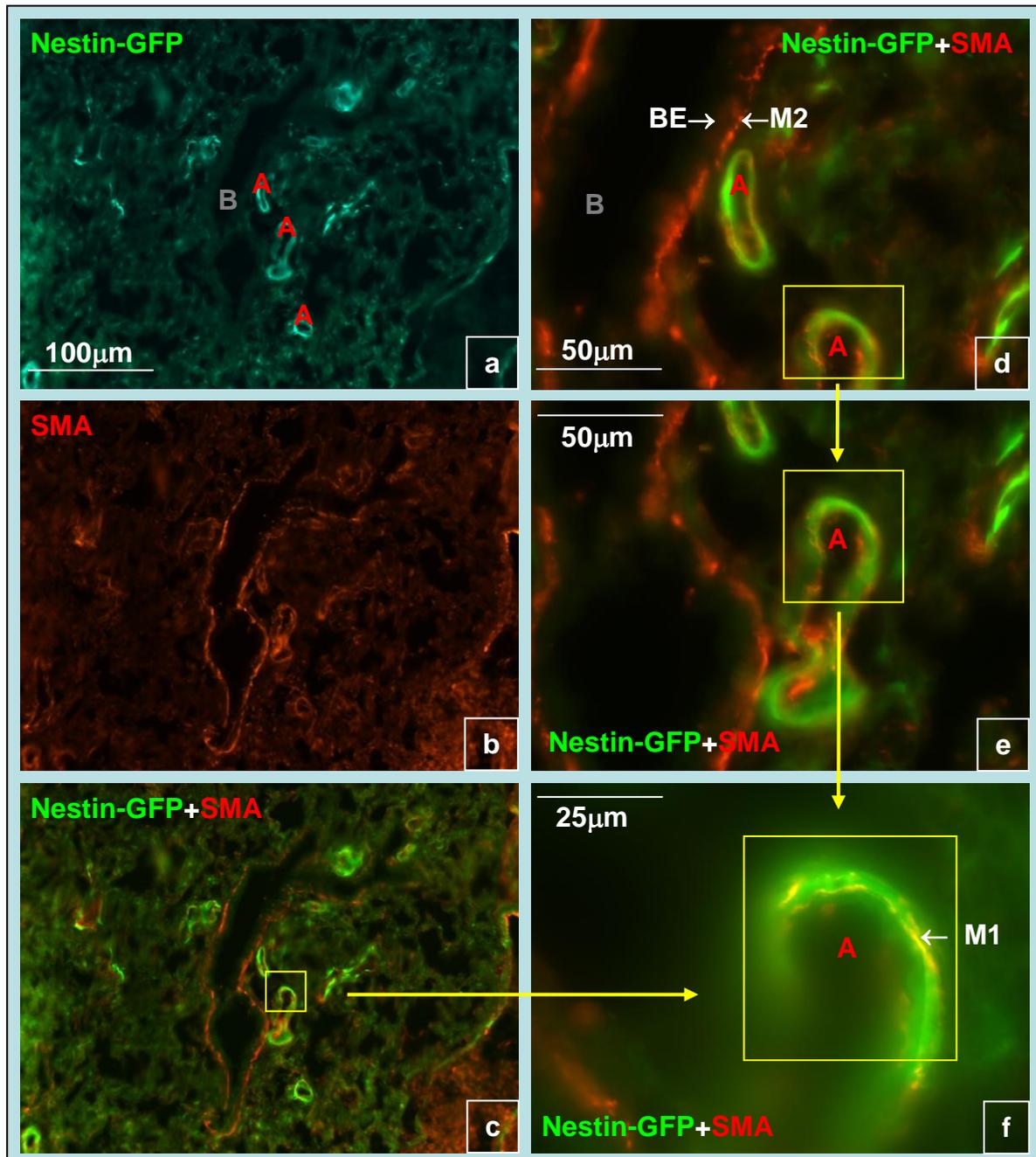


Abb. 18: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA (Nestin-GFP-Maus, d1):

a-c: Übersichtsaufnahme von Gefäßen und Bronchioli in der Lunge; Nestin-GFP-positive Arterien (A) sind benachbart zum Nestin-GFP-negativen Bronchiolus (B)

d-f: Nestin-GFP-negatives Bronchialepithel (BE); Nestin-GFP-negative und SMA-positive glatte Muskelzellen des Bronchiolus (M2); Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelnzellen (M1)

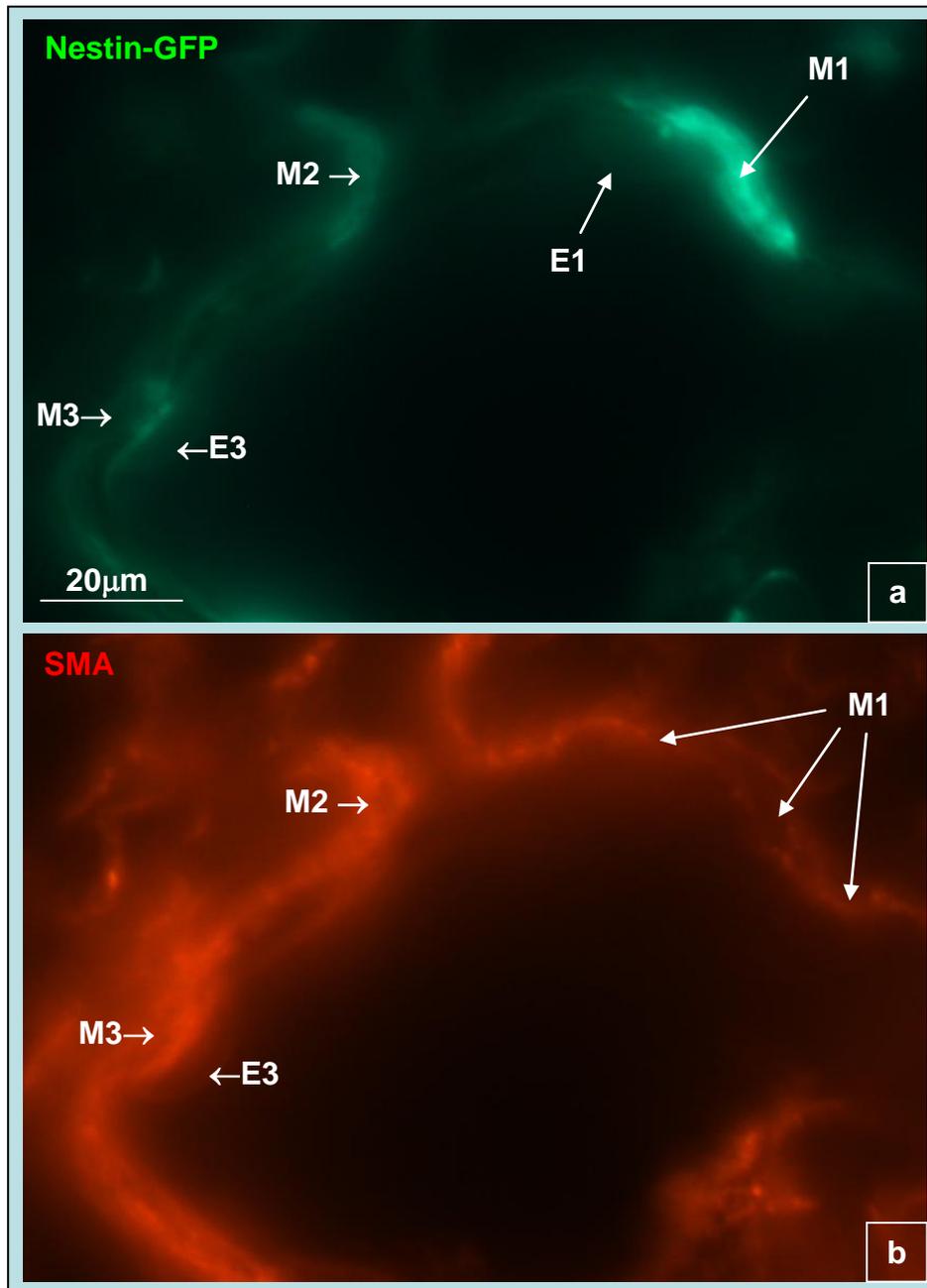


Abb. 19: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA (Nestin-GFP-Maus, ad):

a und b: Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M1 und M3) liegen lumenfern der Nestin-GFP-negativen Endothelzellen (E1 und E3);

Zelle M1: Nestin-GFP-Expression im Kern, SMA-Expression im Zytoplasma

a: Zelle M1 zeigt stärkeres Nestin-GFP-Signal als Zelle M2 und Zelle M3

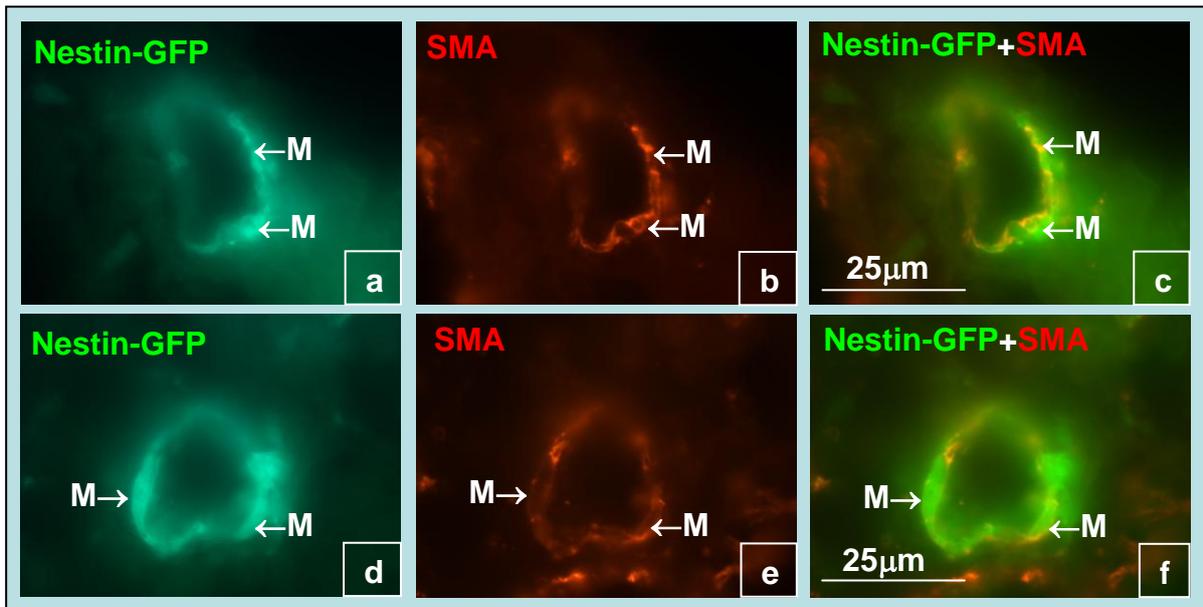


Abb. 20: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA (Nestin-GFP-Maus, d1):

a-f: Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M)

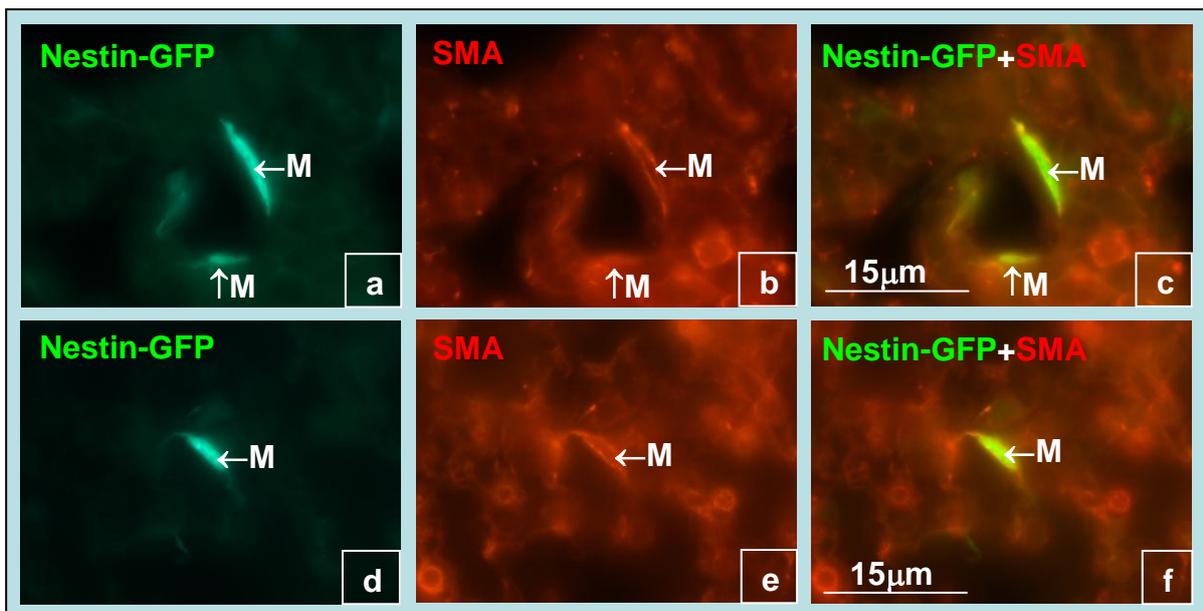


Abb. 21: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA:

a-f: Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M); Nestin-GFP-Expression befindet sich auch im Kern und SMA-Expression ist ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert

a-c: Nestin-GFP-Maus, d1; d-f: Nestin-GFP-Maus, ad

Daneben existieren SMA-markierte Zellen, die nicht Nestin-GFP positiv sind (Abb. 22, siehe M2). Bilder mit dem konfokalen Mikroskop unterstützen die Beobachtung, dass nicht sämtliche SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen Nestin-GFP aufweisen (Abb. 23, siehe M2). Eine Koexpression von SMA und Nestin-GFP ist somit in einer Subpopulation von glatten Gefäßmuskelzellen zu beobachten (Abb. 22, Abb. 23, siehe M1). Bei den adulten Nestin-GFP-Mäusen macht diese Subpopulation der Nestin-GFP-positiven glatten Gefäßmuskelzellen zu allen vorliegenden glatten Gefäßmuskelzellen schätzungsweise 10% aus.

Zusätzlich angefertigte Färbungen zu SMA mit DAPI zur Kernfärbung der Lungen von Nestin-GFP-Mäusen bestätigen die Kolo-kalisation von Nestin-GFP und SMA. Besonders die Lokalisation von Nestin-GFP im Kern (Mignone et al. 2004) ist in diesen Bildern erkennbar (Abb. 24a-d, siehe M). Deutlich herausgestellt ist die gestreckte Form der glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 24e-h, siehe M).

Es lag eine häufige Kolo-kalisation von Nestin-GFP und SMA in den Gefäßwänden der Lunge vor. Allerdings waren ebenfalls glatte Gefäßmuskelzellen zu finden, die nicht Nestin-GFP exprimierten. Somit stellten die Nestin-GFP-exprimierenden Zellen eine Subpopulation von glatten Gefäßmuskelzellen dar. Die zu findende Koexpression von Nestin-GFP und SMA von denselben Zellen identifizierte die glatten Gefäßmuskelzellen als den vorherrschenden Zelltyp der Nestin-Expression.

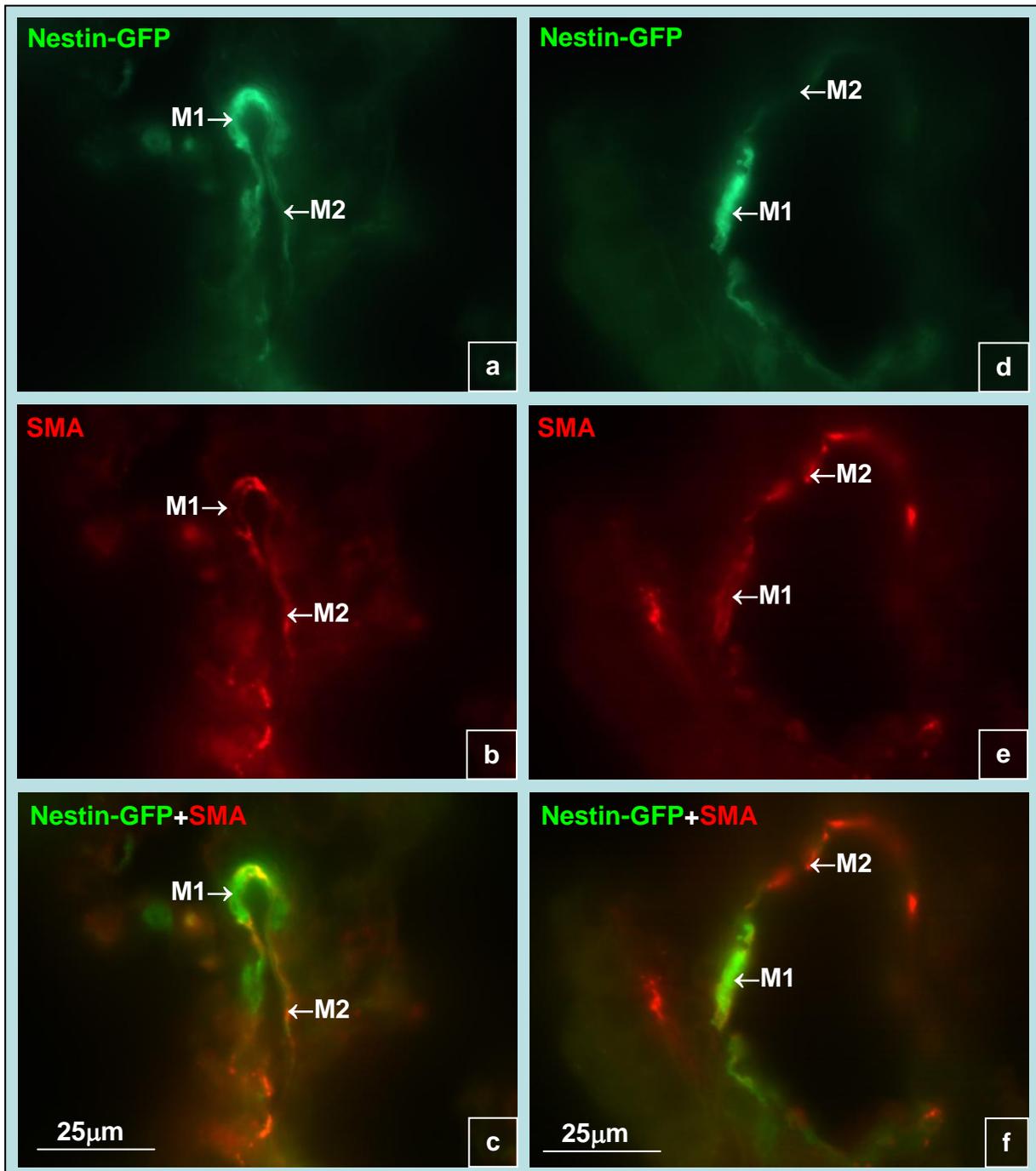


Abb. 22: zum Teil auftretende Kolo-kalisation von Nestin-GFP und SMA (Nestin-GFP-Maus, ad); Nestin-GFP-exprimierende Zellen stellen eine Subpopulation der glatten Gefäßmuskelzellen dar:
a-f: Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M1); Nestin-GFP-negative und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M2)

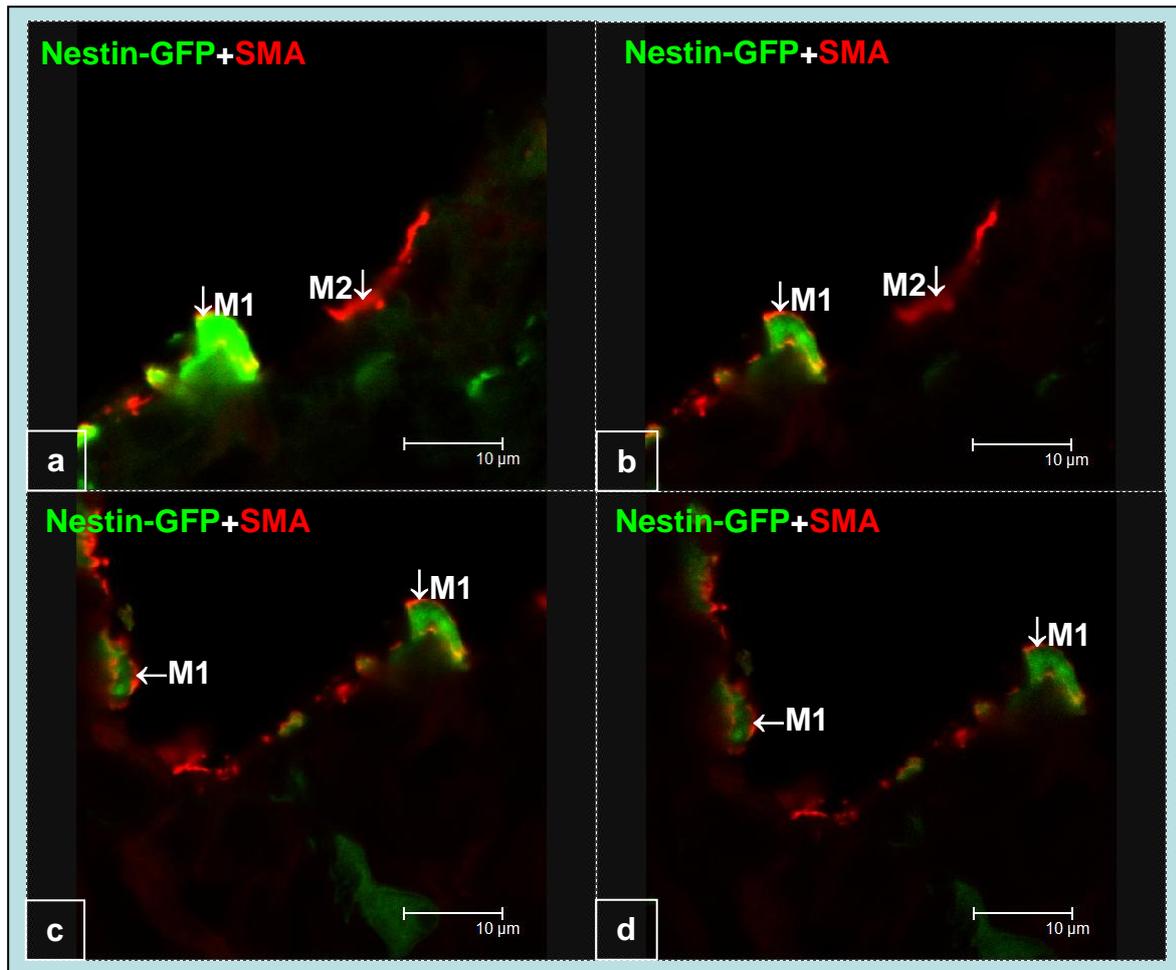


Abb. 23: Zum Teil auftretende Kolo-kalisation von Nestin-GFP und SMA (konfokales Mikroskop); Nestin-GFP-exprimierende Zellen stellen eine Subpopulation der glatten Gefäßmuskelzellen dar:
a-f: Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M1); Nestin-GFP-negative und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzelle (M2)

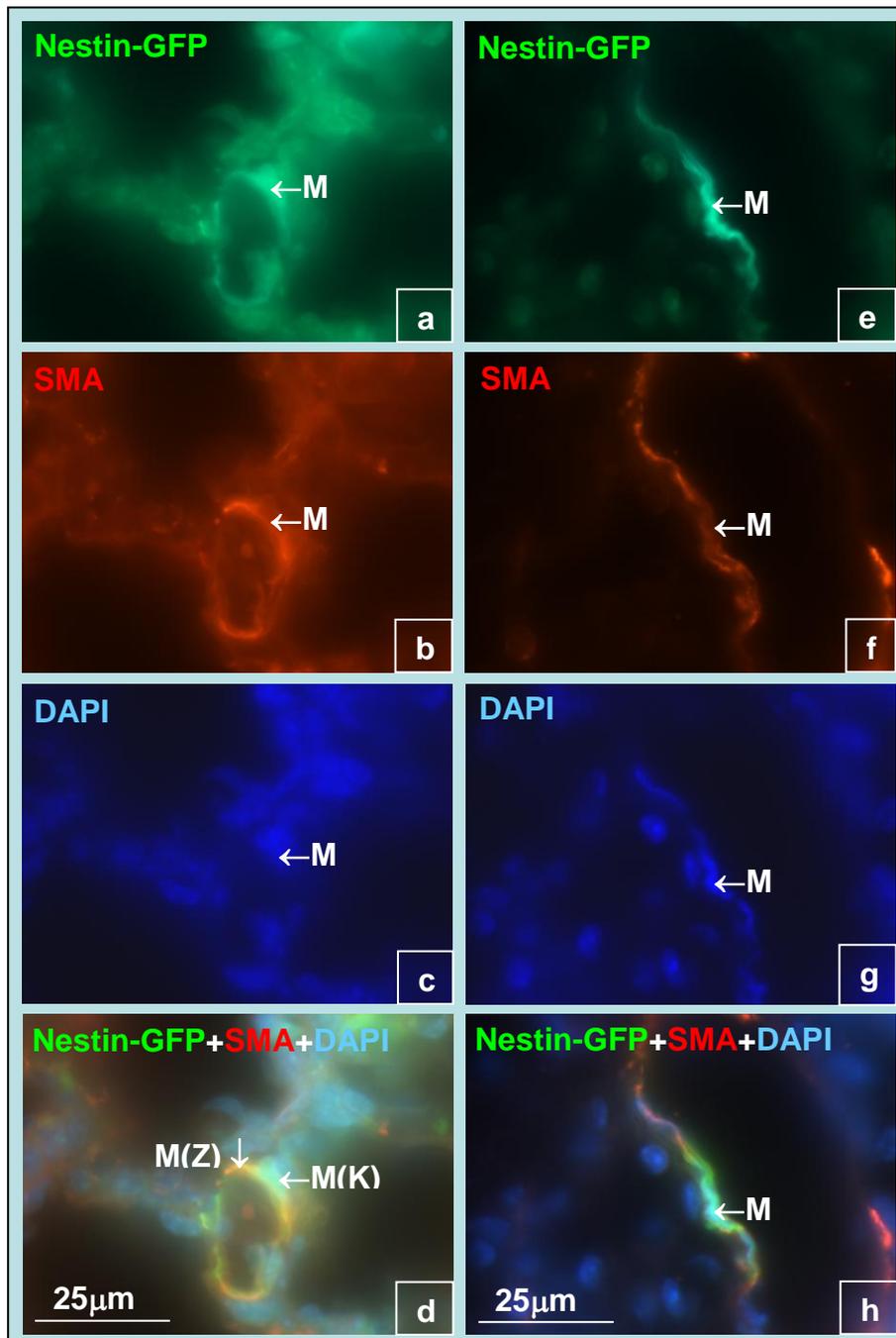


Abb. 24: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA:

a-h: Nestin-GFP-positive und SMA-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M)

a-d: typische Nestin-GFP-Expression auch im Kern (M(K)) (Nestin-GFP-Maus, d1); Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA (M(Z))

e-h: typische gestreckte Form der glatten Gefäßmuskelzelle (M) (Nestin-GFP-Maus, ad)

4.3.2 Nestin-GFP-Expression in Kapillaren

Zusätzlich zu den Beobachtungen von Nestin-GFP-Expression in größeren Blutgefäßen wurden Kapillaren auf Nestin-GFP-exprimierende Zellen untersucht.

Bei den Betrachtungen der Kapillaren ist zu erwähnen, dass die Wand von Kapillaren in der Regel aus zwei Zellschichten, Endothelzellschicht und Perizyten, besteht (Drenckhahn 2004). Perizyten sind meistens eng an das Endothelrohr angelagert; dort verschmilzt die Basallamina der Perizyten mit der endothelialen Basallamina (Kovacic et al. 2009, Drenckhahn 2004). Zwischen Fortsätzen der Perizyten und den Endothelzellen existieren Kontakte zur mechanischen Verbindung (Desmosomen) und Kontakte zur metabolischen und elektrischen Kommunikation (Nexus) (Kovacic et al. 2009, Hayden et al. 2008). In der Lunge beträgt das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen annäherungsweise 1:10 (Shepro et al. 1993).

Das Anfärben mit SMA-Antikörpern und deren Kolo-kalisation mit Nestin-GFP sprechen für Perizyten als mögliche weitere Zellen der Nestin-Expression. Die Nestin-GFP-Expression von Endothelzellen wurde durch den Gebrauch des Endothelzellmarkers CD31 ausgeschlossen.

4.3.2.1 Fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und dem Endothelzellmarker CD31 in Kapillaren

Lungen von Nestin-GFP-Mäusen wurden mit dem gegen die Endothelzellen gerichteten Antikörper CD31 angefärbt.

Die Abb. 25 zeigt eine CD31-Färbung der Kapillaren. Es sind Nestin-GFP-markierte Zellen zu finden, die zirkulär um Endothelzellen angeordnet sind (Abb. 25, siehe P und *(Lumen der Kapillare, auch nachgezeichnet)). Diese werden im Folgenden als Perizyten angesprochen (Abb. 25, siehe P).

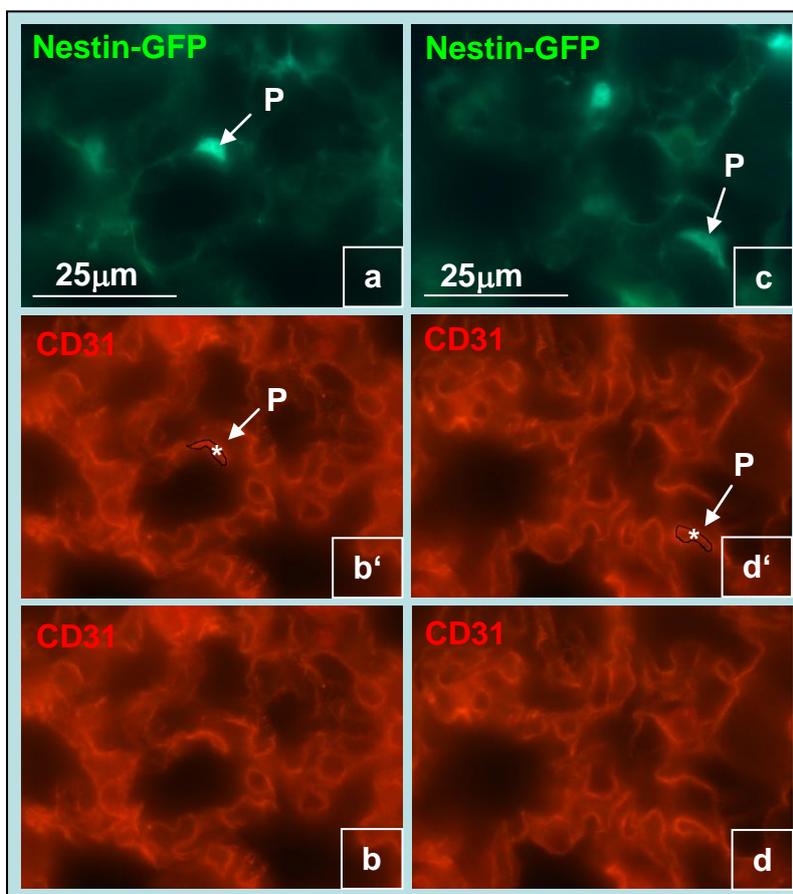


Abb. 25: fehlende Kolokalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Kapillaren (Nestin-GFP-Maus, ad):

a-d: P= Nestin-GFP-positive Perizyten

b',d': das Lumen (*) der Kapillaren ist nachgezeichnet

Die Abb. 26 und die Abb. 27 verdeutlichen die Beobachtung der nicht vorliegenden Koexpression von Nestin-GFP und CD31 und demonstrieren die Lokalisation der Nestin-GFP-positiven Perizyten in engster Nachbarschaft zu Endothelzellen (Abb. 26, Abb. 27, siehe P). CD31-positive Endothelzellen, die nicht Nestin-GFP exprimieren, sind in diesen Abbildungen deutlich herausgestellt worden (Abb. 26, Abb. 27, siehe E). Es liegt somit keine Koexpression von CD31 und Nestin-GFP vor. Klar erkennbar sind die Markierung des Kerns (Mignone et al. 2004) des Perizyten durch Nestin-GFP (Abb. 27c, siehe P(K)) und die Nestin-GFP-positiven Fortsätze des Perizyten (Abb. 27c, siehe P(F)).

Die Färbungen der Lungen von Nestin-GFP-Mäusen mit dem Endothelzellmarker CD31 ermöglichten bei der Betrachtung der Kapillaren auf Nestin-GFP-Expression die Aussage, dass die den Endothelzellen eng benachbarten Perizyten mutmaßlich die Nestin-GFP-exprimierenden Zellen sind. Die Endothelzellen wiesen keine Nestin-GFP-Expression auf. Somit handelt es sich auch bei den Perizyten zusätzlich zu den identifizierten glatten Gefäßmuskeln um Nestin-GFP-exprimierende Zellen. Zur letztendlichen Absicherung der angesprochenen Nestin-GFP-positiven Zellen als Perizyten stehen weitere ultrastrukturelle Untersuchungen noch aus.

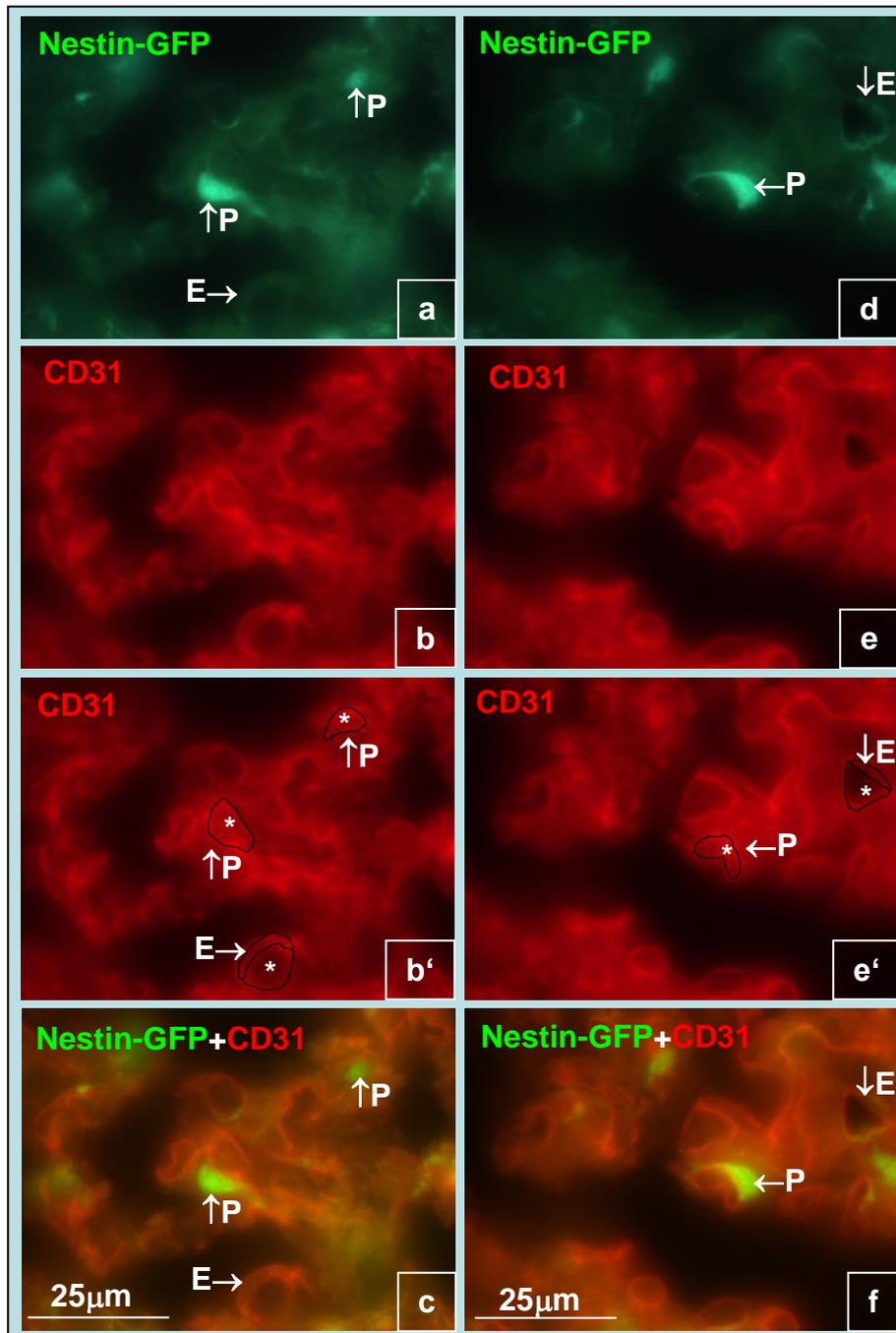


Abb. 26 fehlende Kolo-kalisation von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Kapillaren (Nestin-GFP-Maus, d1):
a-f: Nestin-GFP-positive Perizyten (P) und Nestin-GFP-negative Endothelzellen (E)
b', e': das Lumen (*) der Kapillaren ist nachgezeichnet; der Kern der Endothelzelle ist nachgezeichnet (E)

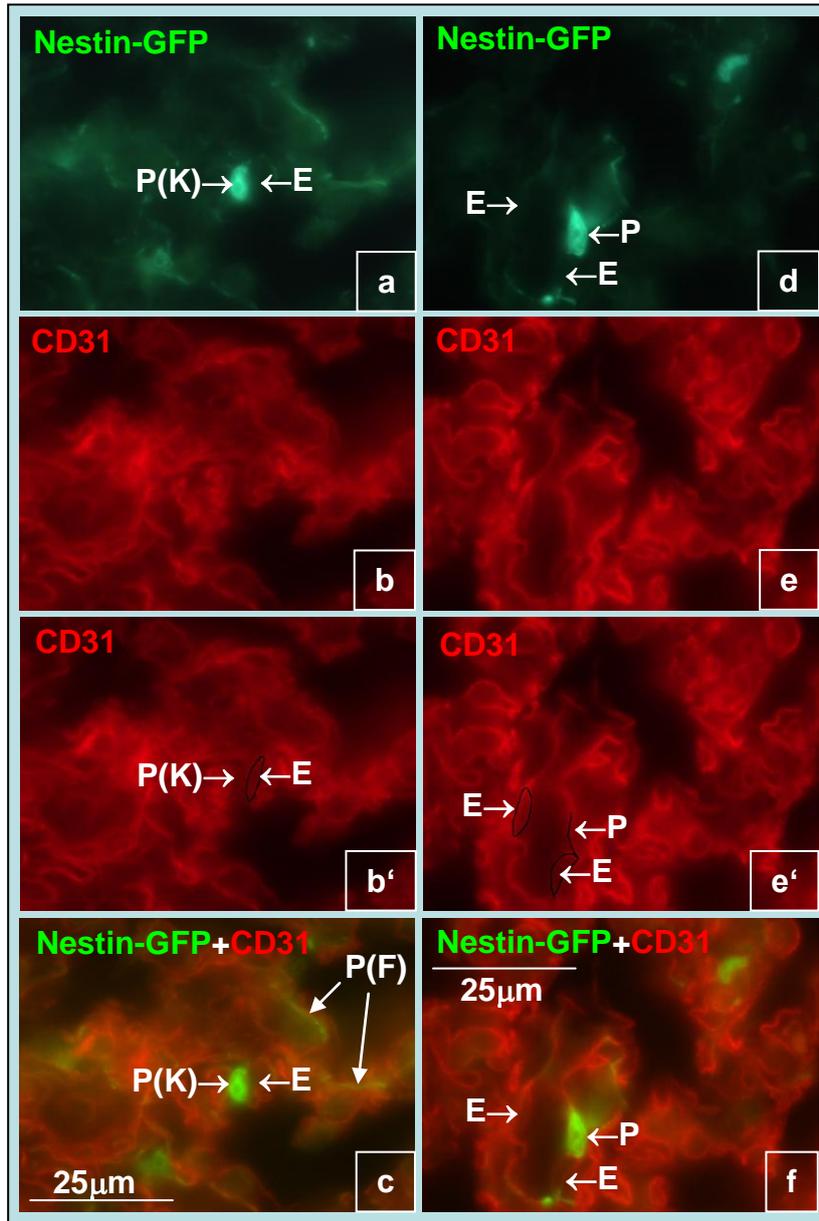


Abb. 27: fehlende Kollokalisierung von Nestin-GFP und Endothelzellmarker CD31 in Kapillaren (Nestin-GFP-Maus, ad):

a-f: Nestin-GFP-positive Perizyten (P) und Nestin-GFP-negative Endothelzellen (E)

c: Nestin-GFP markiert den Kern (P(K)) und die Fortsätze (P(F)) des Perizyten

b': die Endothelzelle ist nachgezeichnet

e': die Kerne der Endothelzellen sind nachgezeichnet (E); der Kern des Perizyten ist nachgezeichnet (P)

4.3.2.2 Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA in Kapillaren

Bei erfolgten immunhistochemischen Untersuchungen mit dem Antikörper SMA wurde auf eine Expression von Nestin-GFP in Perizyten umliegend den Endothelzellen geachtet. Aufgrund der vorhandenen Kontraktilität von Perizyten müssten diese durch eine SMA-Färbung darstellbar sein (Kovacic et al. 2009). Allerdings existieren Studien, die aussagen, dass Perizyten der Lunge kein bzw. weniger SMA aufweisen (Paddenberg et al. 2006, Jostarndt-Fögen et al. 1998).

Die bereits erwähnte häufig vorliegende Lokalisation des Nestin-GFP im Kern (Mignone et al. 2004) bestätigt Abb. 28 (Abb. 28, siehe P(K)). Die bei der Abb. 28 auch vorhandene SMA-Färbung dürfte zum Zytoplasma desselben Perizyten gehören (Abb. 28, siehe P(Z)). Somit scheinen hier Nestin-GFP und SMA kolokalisiert sein.

Allerdings lassen sich einige Perizyten nicht mit SMA anfärben, was exemplarisch die Abb. 29 zeigt. Es stellt sich der Nestin-GFP-positive Perizyt dar, der kein SMA exprimiert. (Abb. 29, siehe P) (Paddenberg et al. 2006, Jostarndt-Fögen et al. 1998).

Die Untersuchungen mit SMA zeigten, dass sich Perizyten nur schwach oder gar nicht mit SMA anfärben lassen.



Abb. 28: Kolokalisation von Nestin-GFP und SMA (Nestin-GFP-Maus, d1):

a-b': Nestin-GFP- und SMA-positiver Perizyt (P)

a: Nestin-GFP im Zytoplasma (P(Z)) und im Kern (P(K)) des Perizyten; Kern des Perizyten ist nachgezeichnet (P(K))

b, b': SMA im Zytoplasma des Perizyten (P(Z))

b': die Kapillare mit Perizyt ist nachgezeichnet; Lumen (*) der Kapillare

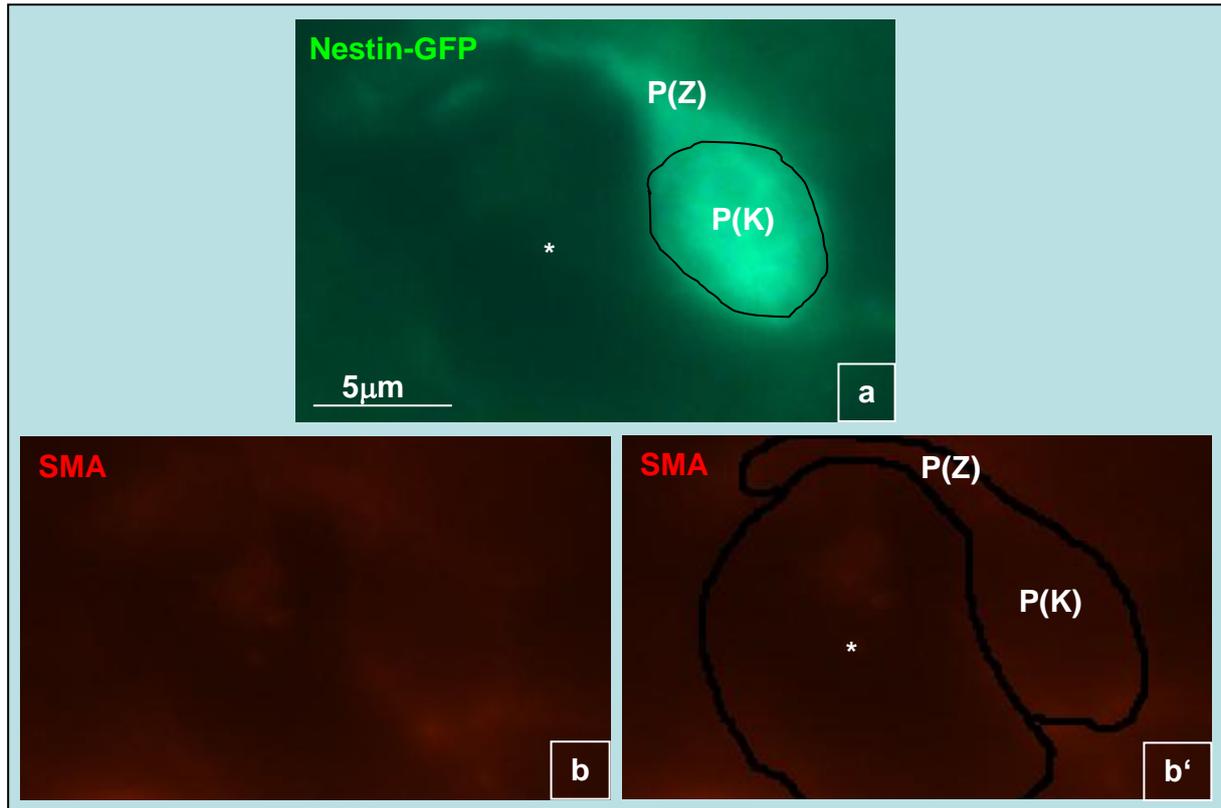


Abb. 29: fehlende Kollokalisierung von Nestin-GFP und SMA (Nestin-GFP-Maus, ad):

a: Lokalisation von Nestin-GFP im Zytoplasma (P(Z)) und im Kern (P(K)) des Perizyten; Kern des Perizyten ist nachgezeichnet (P(K))

b, b': fehlende Expression von SMA

b': das Lumen (ohne Endothelzelle) (*) und Perizyt sind nachgezeichnet

4.4 Übereinstimmung des Nestin-GFP-Signals mit der immunreaktiven Nestin-Expression

Zur Überprüfung, inwieweit die Nestin-GFP-Expression die tatsächliche Nestin-Expression wiedergibt, wurden die Lungen der Nestin-GFP-Mäuse mit einem Antikörper gegen Nestin angefärbt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich Nestin-GFP-positive glatte Gefäßmuskelzellen mit dem Antikörper gegen Nestin anfärben (Abb. 30, Abb. 31, siehe M). Die Kolo-kalisation stellt sich durch die gelbe Färbung dar (Abb. 30c, Abb. 31c). Die Antikörper-Färbung zeigt sich erwartungsgemäß im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 30b,c und Abb. 31b,c, siehe M(Z)), wohingegen der Kern vom immunreaktiven Nestin ausgespart ist (Abb. 30b und Abb. 31b, siehe \diamond). Der Kern (Mignone et al. 2004) der glatten Gefäßmuskelzellen stellt sich dagegen positiv für das GFP-Signal dar (Abb. 30a,c und Abb. 31a,c, siehe M(K)). Endothelzellen zeigen in der Regel keines der beiden Signale. In einem Einzelfall war ein sehr schwaches GFP-Signal sichtbar (Abb. 30, siehe E).

Zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen mit anti-Nestin und DAPI bestätigen die bereits beschriebene Lokalisation von Nestin in glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 32, siehe M). In der Abb. 32 sind deutlich die Kerne der glatten Gefäßmuskelzellen und die der Endothelzellen dargestellt (Abb. 32b,c, siehe M und E). Man erkennt, dass das Nestin-GFP-Signal das Zytoplasma und den Kern der glatten Gefäßmuskelzelle markiert (Abb. 32c, siehe M) und die anti-Nestin-Färbung im Bereich des Zytoplasmas derselben Zelle zu finden ist (Abb. 32a, siehe M). Im Kern der glatten Gefäßmuskelzellen befindet sich keine anti-Nestin-Färbung (Abb. 32a, siehe \diamond).

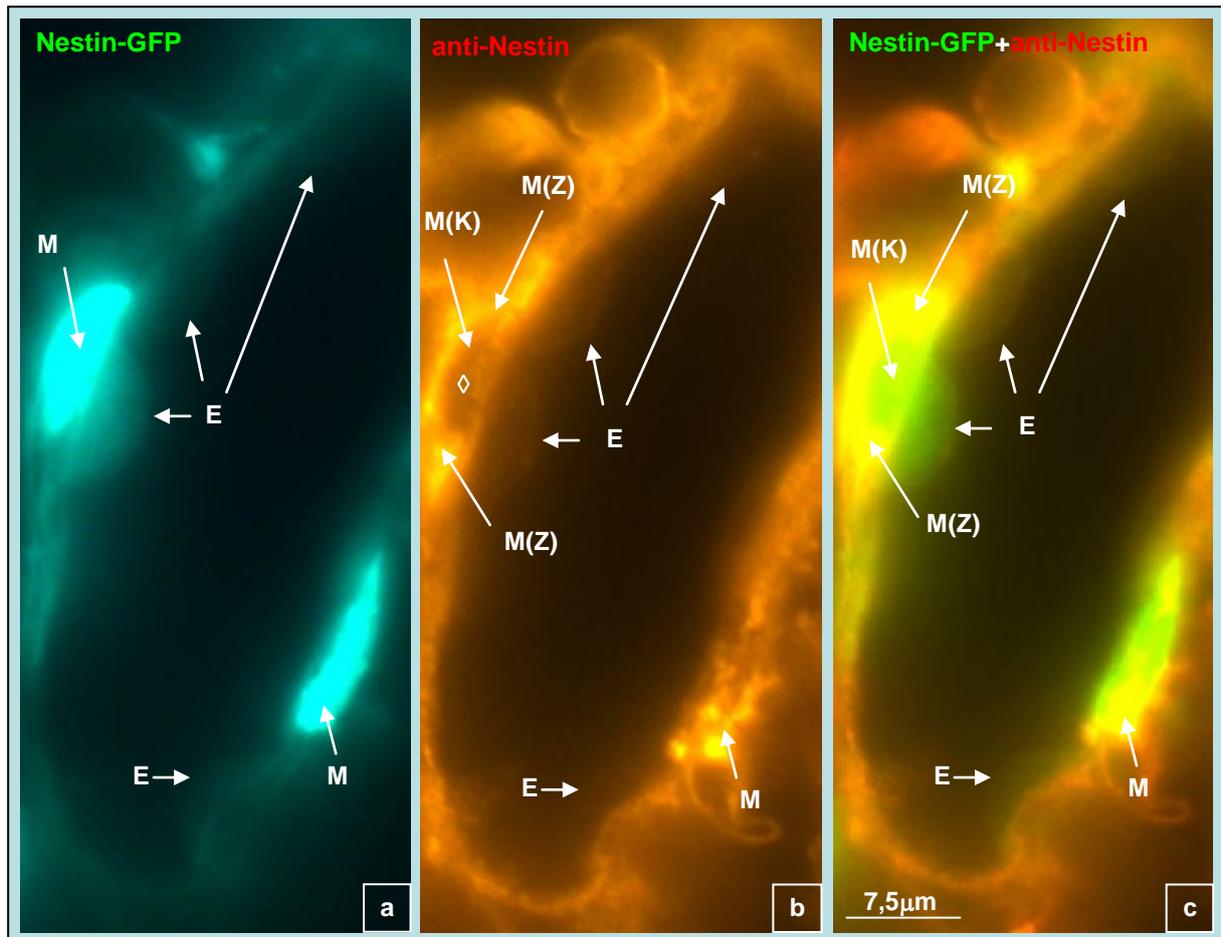


Abb. 30: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin (Nestin-GFP-Maus, ad); Nestin-GFP-positive und anti-Nestin-positive glatte Gefäßmuskelzellen (M); Nestin-GFP-negative und anti-Nestin-negative Endothelzellen (E):

a: Nestin-GFP-Signal im Kern und Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzelle (M)

b: anti-Nestin-Färbung im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzelle (M(Z)); Kern der glatten Gefäßmuskelzelle ist von anti-Nestin ausgespart (◊)

c: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin in glatten Gefäßmuskelzellen (M und M(Z)) (gelbe Färbung)

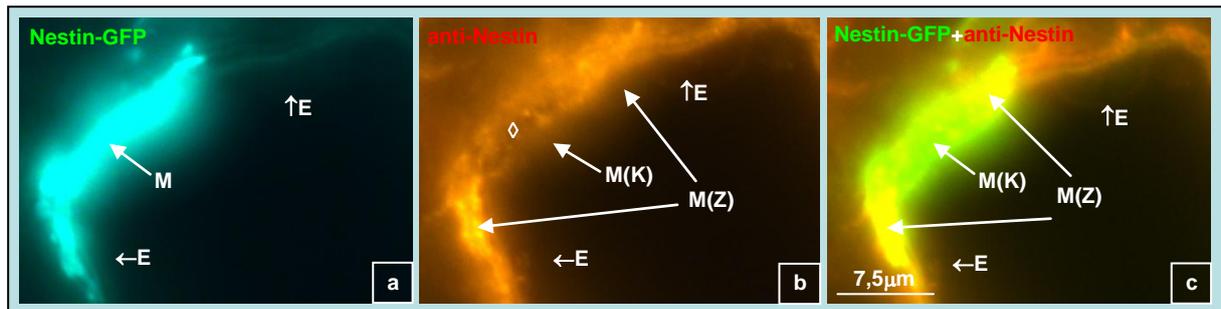


Abb. 31: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin (Nestin-GFP-Maus, ad); Nestin-GFP-positive und anti-Nestin-positive glatte Gefäßmuskelzelle (M); Nestin-GFP-negative und anti-Nestin-negative Endothelzellen (E):

a: Nestin-GFP-Signal im Kern und im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzelle (M)

b: anti-Nestin-Färbung im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzelle (M(Z)); Kern der glatten Gefäßmuskelzelle ist von anti-Nestin ausgespart (◊)

c: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin in glatter Gefäßmuskelzelle (M(Z)) (gelbe Färbung)

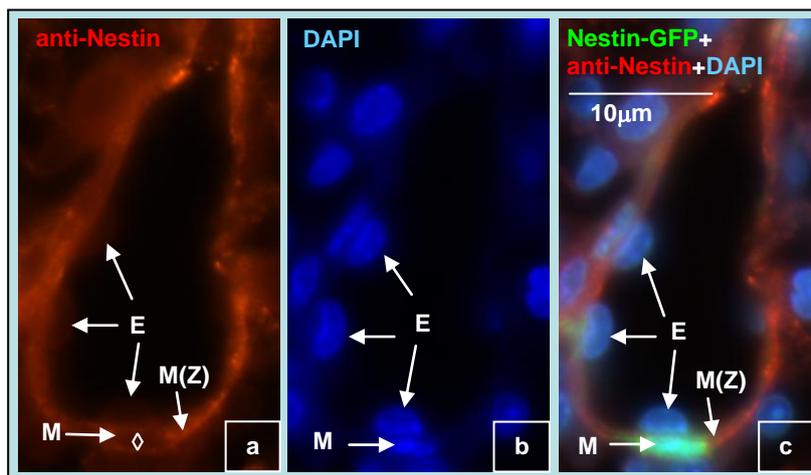


Abb. 32: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin (Nestin-GFP-Maus, ad); Nestin-GFP-positive und anti-Nestin-positive glatte Gefäßmuskelzelle (M); Nestin-GFP-negative und anti-Nestin-negative Endothelzellen (E):

a: anti-Nestin-Färbung im Zytoplasma (M(Z)) und fehlende Färbung im Kern der glatten Gefäßmuskelzelle (◊)

b: DAPI-Färbung

c: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin in glatter Gefäßmuskelzelle (M)

b,c: Kern sowohl der glatten Gefäßmuskelzelle (M) als auch der Endothelzelle (E) dargestellt

Auch in Perizyten lässt sich eine Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin im Zytoplasma, was durch gelbe Färbung zu erkennen ist, beobachten (Abb. 33c,f, siehe P(Z)). Dabei ist erneut klar zu erkennen, dass Nestin-GFP neben dem Zytoplasma auch den Kern markiert (Abb. 33a,d, siehe P(Z) und P(K)) und anti-Nestin ausschließlich im Zytoplasma der Perizyten lokalisiert ist (Abb. 33b,e, siehe P(Z)).

In glatten Gefäßmuskelzellen (Abb. 30-Abb. 32) und in Perizyten (Abb. 33) lassen sich die Signale von Nestin-GFP und dem Antikörper gegen Nestin beobachten. Somit kann man davon ausgehen, dass das Nestin-GFP-Signal mit der immunreaktiven Nestin-Expression übereinstimmt.

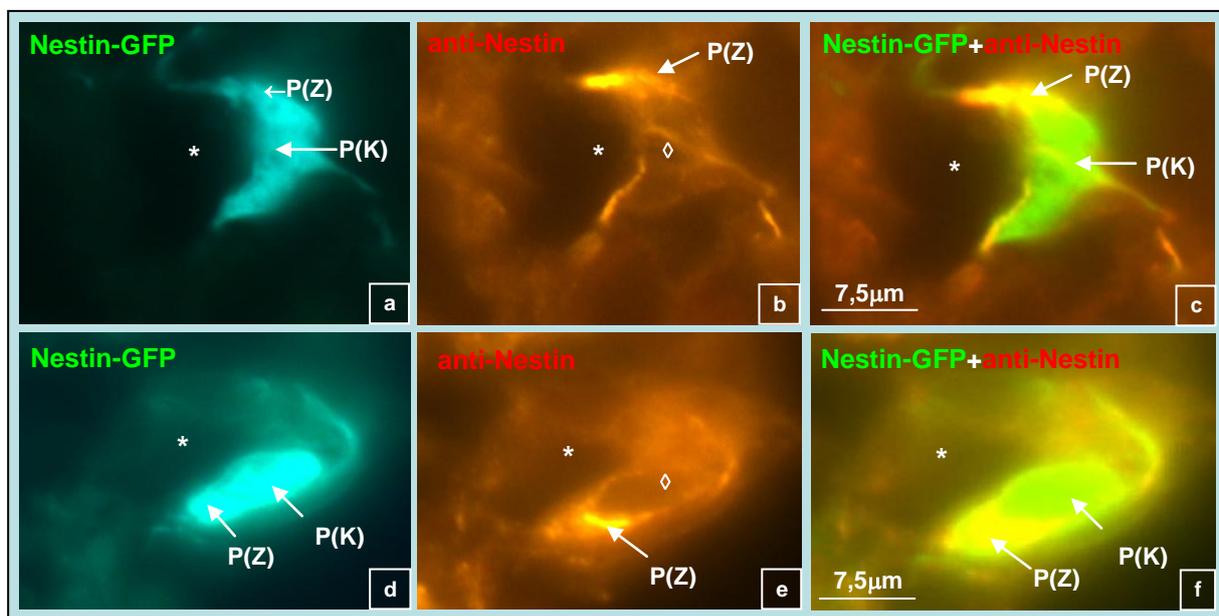


Abb. 33: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin im Zytoplasma der Perizyten (P(Z)) (Nestin-GFP-Maus, ad); Lumen (*) der Kapillaren sind dargestellt:

a,d: Nestin-GFP-Signal im Zytoplasma (P(Z)) und im Kern (P(K)) der Perizyten

b,e: anti-Nestin-Färbung im Zytoplasma (P(Z)) und fehlende Färbung im Kern der Perizyten (◇)

c,f: Kolokalisation von Nestin-GFP und anti-Nestin im Zytoplasma der Perizyten (P(Z)) (gelbe Färbung)

4.5 Unterschiede der Nestin-Expression in neugeborenen und adulten Mäusen

Die Quantität der Nestin-Expression in den Lungen der neugeborenen und adulten Mäuse wurde in der Immunhistochemie und im Western Blot abgeschätzt. Es ist bekannt, dass in neugeborenen Mäusen eine vermehrte Proliferation von Zellen bei Umbauprozessen nach der Geburt zu finden ist (Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975). Somit ist aufgrund der Eigenschaft von Nestin, als ein Marker für proliferationsfähige Vorläuferzellen zu fungieren, eine vermehrte Nestin-Expression in neugeborenen Mäusen im Vergleich zu adulten Mäusen zu erwarten.

Bei den neugeborenen und adulten Nestin-GFP-Mäusen handelt es sich um dieselben Nestin-GFP-exprimierenden Zelltypen, nämlich glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten. Im Vergleich der Menge der Nestin-Expression der neugeborenen und adulten Mäuse zeigt sich aber tatsächlich ein deutlicher Unterschied. Die neugeborenen Nestin-GFP-Mäuse zeichnen sich durch eine stark vermehrte Nestin-Expression aus (Abb. 34). Die Arterien der neugeborenen Nestin-GFP-Mäuse weisen im Vergleich zu den Arterien der adulten Nestin-GFP-Mäuse eine vielfach höhere Anzahl von Nestin-GFP-positiven Zellen auf. Dabei ist zusätzlich zu beobachten, dass das Nestin-GFP-Signal der Arterien neugeborener Tiere stärker ist als das der adulten Arterien (Abb. 34).

Sowohl größere Gefäße (Arterien) (Abb. 35a,b) als auch kleinere Gefäße (Kapillaren) (Abb. 35c,d) der neugeborenen Nestin-GFP-Mäuse zeigen eine höhere Anzahl von Nestin-GFP-exprimierenden Zellen als die Gefäße der adulten Nestin-GFP-Mäuse unterschiedlichen Durchmessers.

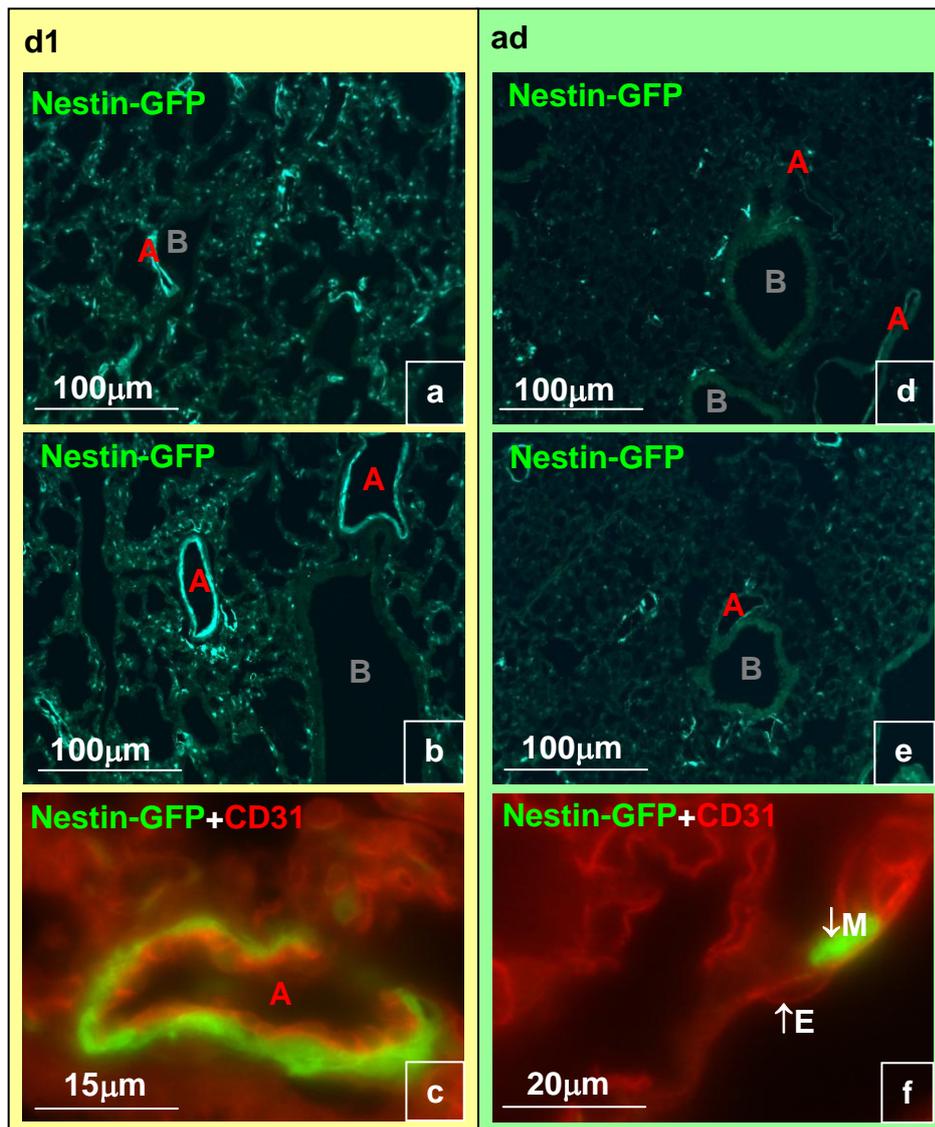


Abb. 34: Vergleich der Nestin-GFP-Expression der d1 und ad Nestin-GFP-Mäuse:

a-c: vermehrte Nestin-GFP-Expression der d1 Nestin-GFP-Maus; Arterien (A) zeigen ein starkes Nestin-GFP-Signal und eine höhere Anzahl von Nestin-GFP-positiven Zellen; Bronchioli (B) weisen keine Nestin-GFP-Expression auf

d-f: verminderte Nestin-GFP-Expression der ad Nestin-GFP-Maus; Arterien (A) zeigen ein schwächeres Nestin-GFP-Signal und eine niedrigere Anzahl von Nestin-GFP-positiven Zellen; Bronchioli (B) weisen keine Nestin-GFP-Expression auf

f = identisch mit Abb. 14d

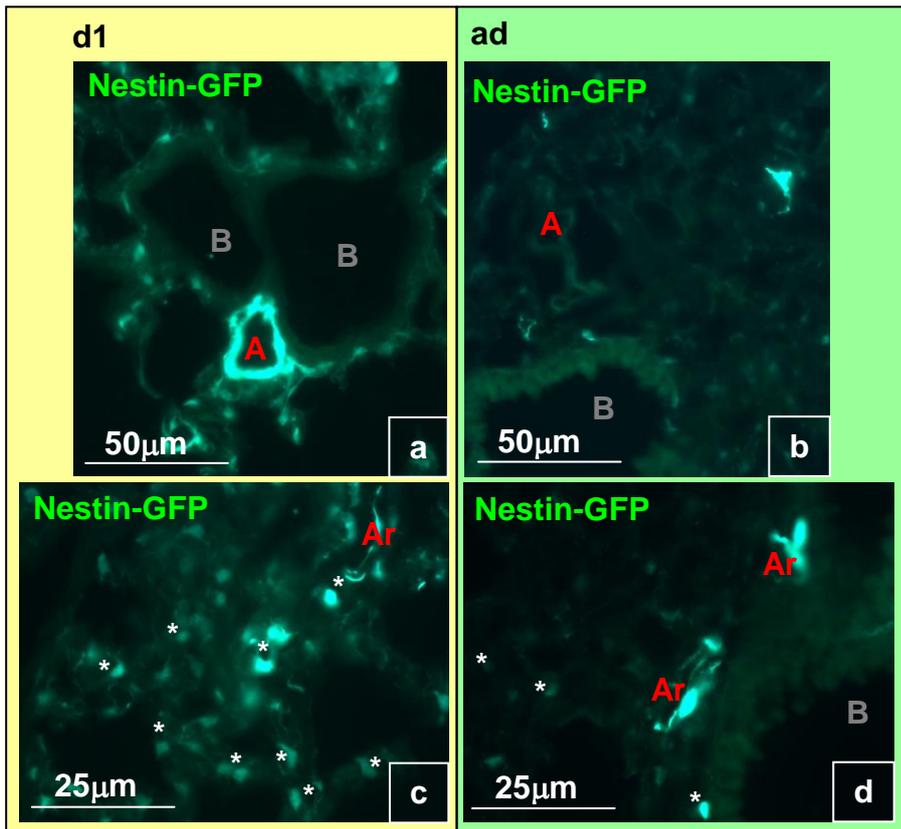


Abb. 35: Vergleich der Nestin-GFP-Expression der d1 und ad Nestin-GFP-Mäuse:

a: vermehrte Anzahl Nestin-GFP-exprimierender Zellen in einer Arterie (A) der d1 Nestin-GFP-Maus

b: verminderte Anzahl Nestin-GFP-exprimierender Zellen in einer Arterie (A) der ad Nestin-GFP-Maus

c: vermehrte Anzahl Nestin-GFP-exprimierender Zellen in Arteriolen und in Kapillaren (Lumen (*) der Kapillaren) der d1 Nestin-GFP-Maus

d: verminderte Anzahl Nestin-GFP-exprimierender Zellen in Arteriolen und in Kapillaren (Lumen (*) der Kapillaren) der ad Nestin-GFP-Maus

Auch im Western Blot wird gezeigt, dass neugeborene Mäuse gegenüber adulten Mäusen eine vermehrte Nestin-Expression aufweisen (Abb. 36a). Die Analysen demonstrieren neben der Hauptbande, die ein Protein von ca. 200 kDa markiert, dem Molekulargewicht von Nestin, zusätzliche Nestin-immunreaktive Banden, die von unserer Arbeitsgruppe schon in früheren Studien beschrieben wurden (Müller et al. 2009) und höchstwahrscheinlich Degradationsprodukte von Nestin darstellen (Sahlgren et al. 2006).

Als Kontrolle der Nestin-Expression in der Lunge dient der Vergleich mit der Nestin-Expression von EDS-behandelten Ratten. Bei diesen Ratten war durch die Gabe von EDS die bestehende Leydig-Zell-Population eliminiert worden und anschließend war eine erhöhte Nestin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten mit nachfolgender Differenzierung in Testosteron-produzierende Leydig-Zellen beobachtet worden (Abb. 36a) (Davidoff et al. 2004). Die Ponceau-Färbung zeigt, dass das stärkere Nestin-Signal in der postnatalen Lunge und im EDS-behandelten Hoden nicht auf größere Mengen der untersuchten Proteine zurückzuführen ist (Abb. 36b).

Sowohl morphologisch im Nestin-GFP-Modell (Abb. 34, Abb. 35) als auch im Western-Blot (Abb. 36) war die Nestin-Expression der Lunge von neugeborenen Mäusen deutlich höher als bei adulten Mäusen.

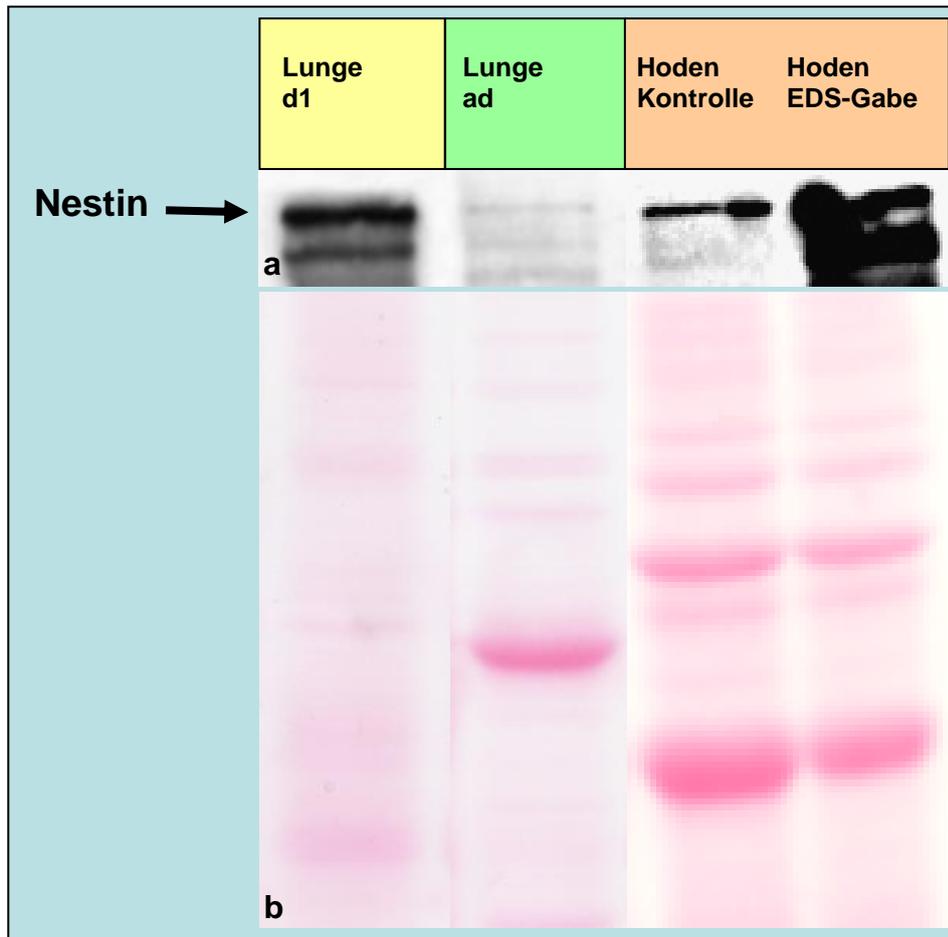


Abb. 36: Vergleich der Quantität der Nestin-Expression der d1 und ad Maus;

a: Western Blot: vermehrte Nestin-Expression der d1 Maus verglichen mit ad Maus;

Kontrolle: bekannter Anstieg der Nestin-Expression bei EDS-behandelten Ratten

b: Ponceau-Färbung der Proteine als „Loading“-Kontrolle

5 Diskussion

Das Intermediärfilament Nestin ist als ein Marker für neuronale Vorläuferzellen bekannt geworden (Lendahl et al. 1990) und seine Expression wurde nachfolgend auch in proliferationsfähigen Progenitorzellen testikulärer Gefäßwände gezeigt (Davidoff et al. 2004). In dieser Arbeit konnte eindeutig die Lokalisation von Nestin in glatten Gefäßmuskelzellen von Gefäßwänden der Lunge nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden Nestin-exprimierende Zellen in Kapillaren beobachtet. Es zeigte sich kein Unterschied in der Lokalisation von Nestin in den Lungen der neugeborenen und adulten Mäuse, wohl aber ein Unterschied im Expressionsniveau.

5.1 Vergleich der Nestin-GFP-Expression mit der Nestin-Immunreaktivität

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Lokalisation von Nestin in erster Linie transgene Nestin-GFP-Mäuse genutzt. Um weitere Hinweise zu erlangen, dass die Nestin-GFP-Markierung die tatsächliche Nestin-Expression wiedergibt, wurden Färbungen mit einem etablierten Antikörper gegen Nestin durchgeführt.

In diesen Versuchen konnte eine Kolo­kalisierung von Nestin-GFP und anti-Nestin in denselben Zellen beobachtet werden. Dabei zeigten sich anti-Nestin-Färbung und Nestin-GFP im Zytoplasma der glatten Gefäßmuskelzellen, dem üblichen Ort der Intermediärfilamente. Zusätzlich waren bei den Nestin-GFP-Tieren auch die Kerne markiert. Diese Beobachtung der Nestin-GFP-markierten Kerne wurde bereits von Mignone und Kollegen (2004) beschrieben.

Mignone und Kollegen (2004) stellten sich auch die Frage, inwieweit die Nestin-GFP-Expression das tatsächliche Vorliegen des endogenen Nestin wiedergibt. Denn obwohl die Anwesenheit von der für das transgene GFP kodierenden mRNA eng mit dem zeitlichen Profil von endogener Nestin mRNA korreliert, sei es denkbar, dass das Protein GFP in der Zelle länger als das endogene Protein Nestin verbleibt. Allerdings gehen sie aufgrund ihrer Beobachtung, dass in Gebieten des Gehirns mit ausdifferenzierten Zellen keine Nestin-GFP-exprimierenden Zellen zu lokalisieren sind und der Tatsache, dass die genutzte Version des Nestin-GFPs eine kurze Halbwertszeit besitzt, davon aus, dass die transgene Nestin-GFP-Markierung die endogene Nestin-Expression wiedergibt (Mignone et al. 2004).

Unsere Beobachtung der Kolo-kalisation des transgenen Nestin-GFPs und der Immunreaktivität des endogenen Nestins beweist ebenfalls die sinnvolle Nutzung der Nestin-GFP-Mäuse zur Bestimmung der Lokalisation von Nestin.

Die Expression des transgenen Nestin-GFPs wird durch das zweite Intron des Nestin-Gens reguliert (Mignone et al. 2004). Das zweite Intron ist für die Nestin-Expression in neuroepithelialen Strukturen verantwortlich (Lothian et al. 1997). Somit sorgt die Regulation über das zweite Intron für eine „neuronal“ Nestin-Expression und deutet auf ein Vorkommen von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten mit neuronalem Hintergrund (Davidoff et al. 2004, Korn et al. 2002), die die entsprechenden Nestin-positiven Zellen darstellen. Passend zu einer neuronal-vaskulären-Verbindung wurde über eine gemeinsame Basis des neuralen und vaskulären Systems berichtet (Davidoff et al. 2004, Belachew et al. 2003, Carmeliet 2003, Korn et al. 2002, Darland et al. 2001, de Ruiter et al. 1989).

5.2 Lokalisation von Nestin-exprimierenden Zellen

Viele der untersuchten Gefäße, die sich in Durchmesser und Art unterschieden, besaßen Nestin-GFP-exprimierende Zellen; d. h. die Gefäßwände von Arterien, Venen, Arteriolen, Venolen und Kapillaren waren Nestin-GFP positiv. In den Luftwegen, die den Nestin-GFP-positiven Arterien benachbart sind, konnten dagegen in keinem der untersuchten Fälle Nestin-GFP-positive Zellen dargestellt werden. Es konnte somit festgestellt werden, dass Nestin-GFP unzweifelhaft in den Gefäßwänden der Lunge lokalisiert ist.

In der Literatur wird die Expression und Lokalisation von Nestin vornehmlich nicht mit Gefäßen, sondern mit neuronalen Vorläuferzellen in Verbindung gebracht, worauf auch dessen Bezeichnung beruht (Akronym: neuroepithelial stem cells protein) (Mignone et al. 2004, Lendahl et al. 1990). Im weiteren Verlauf von Untersuchungen wurde eine Nestin-Expression auch in Progenitorzellen anderer Organe (Bertelli et al. 2007, Bernardo et al. 2006, Davidoff et al. 2004, Wiese et al. 2004, Klein et al. 2003, About et al. 2000, Fröjdman et al. 1997), in unreifen Zellen von Tumoren (Tsujimura et al. 2001, Kobayashi et al. 1998, Flørenes et al. 1994) sowie bei adultem Gewebe in den bei Verletzung auftretenden Zellen beobachtet (Day et al. 2007, Drapeau et al. 2005, Gleiberman et al. 2005, Abdel-Rahman et al. 2004, Davidoff et al. 2004, About et al. 2000, Clarke et al. 1994). Den Nestin-exprimierenden Zellen unterschiedlicher Gewebe werden stammzellähnliche Eigenschaften zugesprochen (Wiese et al. 2004). Von einigen der hier erwähnten organspezifischen Progenitorzellen wird berichtet, in Gefäßwänden lokalisiert zu sein (Dellavalle et al. 2007, Davidoff et al. 2004, Klein et al. 2003). Über eine Nestin-Expression in der Lunge ohne exakte Beschreibung der Lokalisation wird von Amoh et al. (2005) berichtet.

5.2.1 Exakte Lokalisation der Nestin-Expression der Gefäßwand: glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten

Durchgeführte immunhistochemische Untersuchungen der Nestin-GFP-Mäuse mit dem gegen Endothelzellen gerichteten Marker CD31 und den zur Anfärbung der glatten Muskelzellen genutzten SMA-Antikörper ließen eine Nestin-GFP-Expression von glatten Gefäßmuskelzellen und von kapillären Zellen erkennen. Da sich deutliche Anhaltspunkte ergaben, dass es sich bei den kapillären Zellen um Perizyten handelt, werden sie im Folgenden von uns in dieser Weise angesprochen. Die Nestin-Expression in Perizyten soll zukünftig durch ultrastrukturelle Untersuchungen abgesichert werden. Die meisten der durch CD31 markierten Endothelzellen zeigten keine Nestin-GFP-Expression, wohingegen viele der SMA-positiven glatten Gefäßmuskelzellen und die unterschiedlich stark angefärbten SMA-positiven Perizyten eine Kollokalisierung mit Nestin-GFP aufwiesen. Nicht alle glatten Muskelzellen eines Gefäßes und nicht alle vorliegenden Perizyten exprimierten Nestin-GFP. Somit ist von dem Bestehen einer Subpopulation von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten auszugehen, die gekennzeichnet durch ihre Expression von Nestin-GFP Differenzierungs- und Proliferationspotential besitzen. Diese Subpopulation der differenzierungs- und proliferationsfähigen glatten Muskelzellen und Perizyten macht in der adulten Lunge schätzungsweise 10% aller vorliegenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten aus. Im Vergleich dazu sprechen Dellavalle und Kollegen (2007) von etwa 20-40% der Perizyten-abgeleiteten Zellen, die *in vitro* in Muskelfasern differenzieren.

Bei der Beschreibung von Nestin-exprimierenden Zellen in Gefäßen ist zu unterscheiden, ob die Nestin-positiven Zellen bei einer aktuell auftretenden Neovaskularisation, z.B. bei der Entstehung von Tumoren (Teranishi et al. 2007, Amoh et al. 2005, Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004, Kim et al. 2002, Sugawara et al. 2002) und im Verlauf des weiblichen Menstruationszyklus (Aihara et al. 2004) beobachtet werden oder wie in der vorliegenden Arbeit bei der adulten Lunge in Gefäßen ohne wesentliche Neovaskularisation. Die Nestin-Expression in den neu gebildeten Gefäßen der Tumoren wurde in erster Linie den Endothelzellen zugesprochen (Teranishi et al. 2007, Amoh et al. 2005, Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004, Kim et al. 2002, Sugawara et al. 2002). Reife Endothelzellen werden für Nestin-negativ gehalten (Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004).

Allerdings ist durchaus anzuzweifeln, ob es bei den beschriebenen Nestin-exprimierenden Endothelzellen tatsächlich ausschließlich um Endothelzellen handelt. Die publizierten immunhistochemischen Abbildungen zeigten in den meisten Fällen Ausschnitte von angefärbten Gefäßen bei schwächerer Vergrößerung, was die erwähnte Expression von Nestin in Endothelzellen durch die fehlende Abgrenzung zu glatten Gefäßmuskelzellen schwer nachvollziehen lässt (Amoh et al. 2005, Aihara et al. 2004, Mokry et al. 2004). Vor allem kleinere Gefäße werden als vorherrschender Ort der Nestin-Lokalisation genannt (Teranishi et al. 2007, Aihara et al. 2004); bei den kleineren Gefäßen ist es aufgrund der gezeigten Abbildungen denkbar, dass die beschriebenen Nestin-positiven Endothelzellen in einigen Fällen mit den die Kapillaren umgebenden Perizyten verwechselt worden sind. So wurde bei einer Arbeit sogar berichtet, dass durch fehlenden Gebrauch von Markern für Perizyten nicht ausgeschlossen werden konnte, dass es sich bei den Nestin-angefärbten Zellen um Perizyten handelt (Klein et al. 2003).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte eine Nestin-Lokalisation auch in adulten Lungengefäßen erkannt werden, die nicht in Abhängigkeit von aktueller Neovaskularisation entstanden sind; und zwar wurde die Nestin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und in Perizyten beobachtet. Erst kürzlich wurde eine Nestin-Lokalisation in glatten Gefäßmuskelzellen der sich entwickelnden Aorta mit einem Rückgang der Expression nach der Geburt beschrieben (Oikawa et al. 2010). Ebenfalls wurde über die Identifikation von Nestin in glatten Gefäßmuskelzellen und in Perizyten des postnatalen und des regenerierenden Hodens berichtet. Glatte Muskelzellen und Perizyten wurden durch eine Expression von Nestin und SMA charakterisiert (Davidoff et al. 2004). Vom Vorkommen von Nestin in Perizyten und in den sich ähnelnden Sternzellen ist zu erfahren (Dore-Duffy et al. 2006, Aihara et al. 2004, Klein et al. 2004, Alliot et al. 1999). Die Fähigkeit der Perizyten unterschiedlicher Organe in spezielle mesenchymale Zellen zu differenzieren (Crisan et al. 2008), unterstreicht das Potential der von uns in der Lunge gefundenen Nestin-exprimierenden Zellen.

5.2.2 Analogie von Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten

Die gleichzeitig in der vorliegenden Arbeit beobachtete Nestin-GFP-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen und in Perizyten lässt Fragen über eine mögliche Verbindung, eine gemeinsame Herkunft und ähnliche Eigenschaften dieser zwei Zelltypen aufkommen.

Viele Untersuchungen sprechen dafür, dass glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten eine starke Homologie aufweisen und es wird davon ausgegangen, dass die einen Zellen aus den anderen hervorgehen können (Davidoff et al. 2009, Hayden et al. 2008). Über eine gemeinsame Herkunft der glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten bestimmter Organe von Zellen der Neuralleiste wird diskutiert (Müller et al. 2008, Etchevers et al. 2001). Aber es gibt auch Hinweise, dass Perizyten von mesenchymalen Stammzellen bzw. von nativen Knochenmark-Vorläuferzellen abstammen (Diaz-Flores et al. 2009, Ozerdem et al. 2005, Rajantie et al. 2004) bzw. noch Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen besitzen (Crisan et al. 2008).

Glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten werden im adulten Gewebe nicht als völlig ausdifferenzierte Zellen betrachtet (Hayden et al. 2008, Dellavalle et al. 2007, Owens et al. 2004). Stenmark und Kollegen (1998) beschrieben verschiedene Untergruppen von pulmonalen glatten Gefäßmuskelzellen, die einen unterschiedlichen Differenzierungsstatus aufwiesen. Verantwortlich für die bei der durch Hypoxie-induzierten pulmonalen Hypertonie beobachteten Proliferation werden noch relativ unreife und undifferenzierte Zellen gemacht, die nicht den muskel-spezifischen Marker Meta-Vinculin exprimieren (Stenmark et al. 1998). Auch Woehley et al. (1995) sprechen davon, dass bei der neonatalen pulmonalen Hypertonie die Proliferation nahezu vollständig auf die Meta-Vinculin-negative Gruppe von glatten Muskelzellen zurückzuführen ist. Berichtet wird, dass glatte Gefäßmuskelzellen dazu fähig sind, als Antwort auf lokal einwirkende Stimuli ihren Phänotyp zu ändern. Zu den einwirkenden Stimuli werden Faktoren wie Wachstumsfaktoren, mechanische Einflüsse, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und verschiedene inflammatorische Einflüsse gezählt (Owens et al. 2004).

Inwieweit es sich bei der von uns identifizierten Subpopulation von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten um differenzierte Zellen handelt, soll durch zukünftig angestrebte Untersuchungen mit Markern für ausdifferenzierte glatte Muskelzellen geklärt werden. Bisher ist noch ungeklärt, ob die Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen sich noch in der

„Entwicklung“ befinden, somit ein Zwischenstadium darstellen und ihren vollen Kontraktitätsphänotyp erst noch erreichen, oder ob sie bereits völlig ausdifferenziert sind und durch eine Transdifferenzierung erneut eine Veränderung durchleben.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl glatte Gefäßmuskelzellen als auch kapilläre Gefäßwandzellen der Lunge sich durch eine Nestin-GFP-Expression auszeichnen, die das stammzellähnliche Potential dieser beider Zelltypen demonstriert.

Die Anwesenheit von Nestin-Expression und die Beschreibung von unreifen, nicht völlig ausdifferenzierten glatten Gefäßmuskelzellen sowohl in postnatalen Lungengefäßen (Haworth et al. 1987) als auch in adulten Gefäßen (Owens et al. 2004) birgt die Überlegung, dass es sich bei der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Subpopulation ebenfalls um noch differenzierungsfähige Zellen handelt.

5.3 Nestin-exprimierende Gefäßwandzellen als Progenitorzellen

Unsere Analyse von Nestin-exprimierenden (Vorläufer)-Zellen in Gefäßwänden der Lunge von Mäusen ist ein völlig neuer Befund, der sich mit Ergebnissen von Oikawa et al. (2010), Kovacic et al. (2009), Crisan et al. (2008), Sainz et al. (2006), da Silva Meirelles et al. (2006) und Zengin et al. (2006) aus anderen Organen deckt.

Nestin-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen der sich entwickelnden Aorta wurde von Oikawa und Kollegen dargestellt (2010). Zengin et al. (2006) beschrieben Progenitorzellen in adulten humanen Gefäßwänden und Sainz et al (2006) gelang es aus der Tunica media der Aorta von adulten Mäusen Progenitorzellen zu isolieren. Auch da Silva Meirelles et al. (2006) konnten aus größeren Gefäßen, wie der Aorta und der V. cava, und aus kleineren Gefäßen, nämlich denen von Nierenkörperchen, mesenchymale Stammzellen generieren. Eine Verbindung von Perizyten zu mesenchymalen Stammzellen wurde von Crisan et al. (2008) durch die Expression mesenchymaler Marker in Perizyten demonstriert. Nestin-Expression in den oben erwähnten Zellen mit mesenchymalem Charakter wurde von Crisan et al. (2008), Sainz et al (2006) und da Silva Meirelles et al (2006) aber nicht untersucht. Da Silva Meirelles und Kollegen (2006) berichteten, dass die mesenchymalen Stammzellen, die Differenzierungskapazität besitzen und wichtig zur Erhaltung und Reparatur des umgebenen Gewebes sind, in Gefäßwänden ansässig sind und eine Gewebs-spezifische Aktivität erreichen können. Ein Zusammenhang der mesenchymalen Stammzellen mit glatten Gefäßmuskelzellen wurde durch das Vorliegen einer Markierung der Zellen mit SMA-Antikörpern, einer fehlenden Expression von CD31 und ihrer Lokalisation im Bereich der Media, nahe den Endothelzellen, verdeutlicht (da Silva Meirelles et al. 2006). Auch den Perizyten werden eine Funktion als Progenitorzellen und stammzellähnliche Eigenschaften nachgesagt (Davidoff et al. 2009, Crisan et al. 2008, Dore-Duffy et al. 2006, Shepro et al. 1993).

Zirkulierende Stammzellpopulationen sollen in Verbindung mit vaskulärer Verletzung und atherosklerotischen Läsionen zu glatten Gefäßmuskelzell-ähnlichen Zellen führen (Owens et al. 2004). Zirkulierenden mesenchymalen Vorläuferzellen der Monozyten/Makrophagen-Linie wird eine Beteiligung an dem durch Hypoxie induzierten pulmonalen vaskulären Remodelling der Adventitia zugesprochen (Frid et al. 2006). Demgegenüber fanden Davidoff und Kollegen (2004), dass die in der Gefäßwand beobachteten Nestin-positiven Vorläuferzel-

len ursprünglich aus der Gefäßwand selbst stammen und nicht von zirkulierenden Zellen, was u.a. durch die fehlende Anfärbung der Perizyten und glatten Gefäßmuskelzellen mit dem Stammzellmarker CD34 gezeigt worden war. Auch in anderen Organen wird von in Gefäßwänden residierenden Progenitorzellen berichtet (Kovacic et al. 2009, Pacilli et al. 2009, Crisan et al. 2008, Sainz et al. 2006, da Silva Meirelles et al. 2006).

Die hier dargestellten Ergebnisse deuten in Kombination mit unserem Nachweis der Proliferationsmarker proliferating cell nuclear antigen (PCNA) und Ki67 in einer Subpopulation vaskulärer glatter Muskelzellen der Lunge stark daraufhin, dass es sich bei den in den Gefäßwänden der Lunge identifizierten Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten um eine Subpopulation von proliferationsfähigen Vorläuferzellen handelt (Saboore et al. 2009, Berndt et al. 2008).

Die beschriebene Detektion von Proliferation, z.B. via PCNA und Bromdesoxyuridin (BrdU) in Nestin-exprimierenden Zellen, zeigt, dass diese Zellen teilungsfähige Zellen darstellen (Oikawa et al. 2010, Teranishi et al. 2007, Davidoff et al. 2004). Auch unsere weiteren, über die hier vorliegende Arbeit hinausgehenden Befunde, sprechen dafür, dass die Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in den Gefäßwänden der Lunge unter bestimmten Bedingungen proliferieren (Saboore et al. 2009, Berndt et al. 2008).

Somit können die Gefäßwände der Lunge als ein Ort von dort ansässigen differenzierungs- und proliferationsfähigen Zellen angesehen werden. Das Differenzierungs- und Proliferationspotential der Gefäßwände mit seinen stammzellähnlichen Zellen bietet Kapazität zur Reparatur von verletztem Gewebe und Ansätze für klinische Therapien.

5.3.1 Vaskuläre Progenitorzellen in Gefäßwänden – wichtig für den Erhalt der Gefäßwände und für die Bildung extravaskulärer organspezifischer Zelltypen?

Primär sind Blutgefäße für den metabolischen Erhalt und somit zur Aufrechterhaltung der Organfunktionen zuständig. Es zeigte sich weiterhin, dass Blutgefäße auch für induktive Signale, z.B. bei der Organogenese des Pankreas, sorgen (Lammert et al. 2001). Berichtet wurde auch über Nestin-positive Zellen in Kapillaren des Pankreas, die Signale zur Differenzierung von endokrinen Zellen auslösen (Klein et al. 2003).

Zusätzlich zu den initiierenden Signalen wurde dargelegt, dass Blutgefäße auch zelluläre Komponenten für die Entwicklung von organspezifischen Zellen, nämlich Progenitorzellen (s.o. 5.3.), enthalten (Dellavalle et al. 2007, Sainz et al. 2006, Zengin et al. 2006, Davidoff et al. 2004). Dabei ist vorstellbar, dass diese Progenitorzellen der Gefäßwände einerseits in vaskuläre Zellen zu Aufrechterhaltung und Remodelling des Gefäßes (Sainz et al. 2006, Zengin et al. 2006) und andererseits in spezifische Zelltypen der Organe außerhalb der Gefäße differenzieren, wie z.B. in Skelettmuskelfasern und in Leydig-Zellen (Crisan et al. 2008, Dellavalle et al. 2007, Davidoff et al. 2004). Die von uns beschriebenen glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten könnten somit vaskulogene und organspezifische Progenitorzellen in den Gefäßwänden der Lunge darstellen.

Zengin und Kollegen (2006) beschrieben nämlich in den Wänden von adulten humanen Blutgefäßen die Existenz einer vaskulogenen Nische, die als Quelle von Progenitorzellen für postnatale Vaskulogenese dienen würde. Auch die von Sainz und Kollegen (2006) aus Gefäßwänden isolierten und in Kultur behandelten Stammzellen waren in der Lage, Endothelzell-spezifische Proteine wie CD31, vascular endothelial (VE)-Cadherin, von-Willebrand-Faktor (vWF) und das für gewöhnlich von glatten Gefäßmuskelzellen gebildete SMA zu exprimieren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Hauptaufgabe der Nestin-positiven Zellen in der Lunge genauer abzuschätzen.

In die organspezifischen Leydig-Zellen differenzierten sich die von Davidoff und Kollegen (2004) gezeigten Nestin-positiven-Progenitorzellen in Gefäßwänden des Hodens zum einen bei der postnatalen Entwicklung, zum anderen als Reaktion auf die Leydig-Zell-toxische EDS-Injektion. Da Silva Meirelles und Kollegen (2006) sprechen von in Gefäßwänden residierenden Zellen, die schrittweise einen Gewebs-spezifischen Phänotyp annehmen können.

Dass Gefäßwandzellen fähig sind, bei Verletzung eines Gewebes in organspezifische Zellen zu differenzieren, war von Dellavalle und Kollegen (2007) gezeigt worden. Humane adulte Perizyten, die bei einer einzigen Biopsie isoliert worden waren, generierten genug Skelettmuskelfasern, um pädiatrische Patienten mit Morbus Duchenne zu behandeln (Dellavalle et al. 2007). Auch Perizyten aus anderen Organen, wie Pankreas, Fettgewebe und Plazenta, zeigten myogenes Potential (Crisan et al. 2008). Perizyten soll es möglich sein, sich in weitere verschiedene Zelltypen zu differenzieren, wie in die pankreatischen Sternzellen, Fibroblasten/Myofibroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten und Leydig-Zellen (Diaz-Flores et al. 2009, Crisan et al. 2008, Hayden et al. 2007, Davidoff et al. 2004, Farrington-Rock et al. 2004, Doherty et al. 1998).

Die von uns in den Gefäßwänden der Lunge gezeigten Progenitorzellen könnten in Verbindung mit Veränderungen dieses Organs, wie z.B. mit der postnatalen Umstrukturierung des Lungengewebes, stehen. Im Vergleich der Menge der Nestin-Expression in den Lungen der neugeborenen und adulten Mäuse zeigte sich eine vermehrte Nestin-Expression in der postnatalen Lunge im Vergleich zur adulten Lunge. Bei der postnatalen Adaptation der Lunge werden nämlich strukturelle Umbauvorgänge sowohl des Lungenparenchyms als auch der Lungenvaskulatur beschrieben (Harworth. 1995, Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975). Die vor der Geburt als primitiv bezeichnete Vaskulatur durchlebt in den ersten Lebenstagen ein extensives und abruptes Remodelling (Ni et al. 2010). Es wird berichtet, dass die intra-azinären Arterien sehr spät und über die Hälfte nach der Geburt gebildet werden, so dass sich in der Kindheit nur wenige muskuläre Arterien innerhalb des Azinus befinden (Harworth. 1995, Hislop et al. 1973). Die als unreif beschriebenen glatten Gefäßmuskelzellen durchlaufen postnatal Veränderungen; ihre Form wechselt zu einer mehr gestreckten Form und ihre anfangs vor allem synthetischen Eigenschaften werden von anwachsenden kontraktilen Fähigkeiten abgelöst (Harworth. 1995, Harworth et al. 1987). Ebenso verhält es sich mit der Alveolenbildung, die postnatal aus den primären Sacculae in den ersten Lebenstagen beginnt und bis zum 8. Lebensjahr andauert (Schiebler und Schmidt. 2002, Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975). Dabei wurde bei Mäusen und Ratten der Beginn der Alveolenbildung zwischen dem vierten und vierzehnten Tag mit einer anschließenden Reduktion der zellulären Vermehrung beobachtet (Amy et al. 1977, Thurlbeck 1975, Burri 1974). Kürzlich von uns durchgeführte und noch nicht veröffentlichte Ergebnisse demonstrieren in den ersten zwei Wochen postnatal ein kons-

tant hohes Nestin-Level und korrelierend dazu eine vermehrte Anzahl von PCNA-positiven glatten Muskelzellen (Farhan Saboor, persönliche Mitteilung. Auch Ni und Kollegen (2010), die die Vaskulatur der Trachea und der Hauptbronchien als ein etabliertes Modell für die Vaskulatur der Luftwege bezeichnen, sprechen von einer erhöhten Anzahl von Perizyten in den ersten postnatalen Tagen. So ist es denkbar, dass die von uns bei d1 identifizierten proliferations- und differenzierungsfähigen Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in den nachfolgenden Tagen u.a. zur Alveolenbildung beitragen.

Sowohl die großen bzw. die prä-azinären Gefäße als auch die kleineren intra-azinären Gefäße zeigten in unseren Untersuchungen Nestin-exprimierende Zellen. Insbesondere bei der Lunge neugeborener Mäuse wiesen die Muskelschicht der größeren Gefäße und eine Vielzahl der Kapillaren Nestin-Expression auf. Aufgrund der Berichte, dass bereits vor der Geburt die prä-azinären Gefäße fertig angelegt sind (Hislop et al. 1973) und unserer Beobachtung von einer ausgeprägten Nestin-Expression in diesen Gefäßen, ist es denkbar, dass die Nestin-markierten glatten Gefäßmuskelzellen vor allem in Zellen differenzieren, die für die Alveolenbildung benötigt werden. Dagegen werden die intra-azinären Arterien sehr spät und zum Teil nach der Geburt gebildet. Aus diesem Grund ist die Vorstellung nachvollziehbar, dass die Nestin-positiven intra-azinären glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in erster Linie Gefäßspezifische Zellen, aber auch Zellen zur Alveolenbildung bereitstellen. Auch die in der Trachea getätigte Beobachtung eines Remodellings der Gefäße mit einer Neubildung von Kapillaren (Ni et al. 2010) zeigt den Bedarf an Gefäß-spezifischen Zellen, die von der Nestin-positiven Subpopulation bereitgestellt werden könnte.

Die Anzahl der in der adulten Lunge anzutreffenden Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten ist im Vergleich zur neugeborenen Lunge deutlich geringer und macht etwa 10% der gesamten glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in der adulten Lunge aus. Auch beim adulten Tier ist es denkbar, dass diese Subpopulation z.B. zur physiologischen Regeneration des Gewebes oder unter pathologischen Bedingungen, wie bei der pulmonalen Hypertonie, in organspezifische Zellen differenzieren kann, wie zuvor für den Hoden und Skelettmuskel bereits gezeigt worden ist (Dellavalle et al. 2007, Davidoff et al. 2004).

Ob es sich bei der proliferationsfähigen Subpopulation um undifferenzierte Vorläuferzellen handelt oder ob bereits ausdifferenzierte Zellen eine Transdifferenzierung durchleben und

somit gegebenenfalls in einen anderen Zelltyp differenzieren können, ist bislang unklar und soll durch zukünftige Untersuchungen geklärt werden.

Die von uns identifizierte Subpopulation von Nestin-positiven glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in den pulmonalen Gefäßwänden ist fähig, zu proliferieren (Saboor et al. 2009, Berndt et al. 2008) und stellt damit einen Pool von Zellen für die benötigten Umbauvorgänge in der Lunge zur Verfügung. Die proliferierenden Nestin-exprimierenden Zellen könnten sich hierbei sowohl in Lungen-spezifische als auch in die Vaskulatur betreffende Zellen, d.h. z.B. in Alveolarepithelzellen und in ausdifferenzierte glatte Gefäßmuskelzellen, differenzieren.

5.3.2 Rolle der Progenitorzellen bei pathophysiologischen Veränderungen der Gefäßwände und des Lungengewebes

Vorläufige Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen eine zeitgleiche Zunahme von Nestin-Expression, Zellproliferation und PDGF-Rezeptor β -Aktivität in einem bestimmten Zeitintervall bei Hypoxie-induzierter pulmonaler Hypertonie der Maus (Saboor et al. 2009). Die massive Verdickung der Media durch Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen findet als primärer Prozess bei der idiopathischen pulmonalen Hypertonie statt (Grimminger et al. 2010, Schermuly et al. 2005, Yuan et al. 2005, Runo et al. 2003).

Die meisten der genutzten Medikamente zur Therapie der pulmonalen Hypertonie, zu denen Endothelin-Rezeptor-Antagonisten (Rubin et al. 2002), nonparenterale Prostanoiden (Badesch et al. 2004, Olschewski et al. 2002) und Phosphodiesterase 5-Inhibitoren zählen (Ghofrani et al. 2002), sorgen für eine pulmonale Dilatation, wohingegen ein antiproliferativer Effekt umstritten ist (Schermuly et al. 2005). Schermuly und Kollegen (2005) zeigten an üblichen Modellen der pulmonalen Hypertonie (Hypoxie und Monocrotalin), dass die Wirkung des Wachstumsfaktors PDGF, der eine bekannte mitogene Wirksamkeit auf die glatten Gefäßmuskelzellen besitzt, von seinem Antagonisten STI571 (Imatinib) geblockt wird. Imatinib sorgte durch Apoptose und durch die Blockierung der Proliferation für eine Umkehr des Remodelings (Grimminger et al. 2010). Wir fanden in Mäusen mit einer hypoxisch induzierten pulmonalen Hypertonie eine Korrelation der Nestin-Expression mit der PDGF-Rezeptor β -Aktivität und einer PCNA-Markierung (Saboor et al. 2009). Somit ist davon auszugehen, dass die Nestin-GFP-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen unter Hypoxie auf das Wachstumshormon PDGF mit Proliferation reagieren. Von Paddenberg und Kollegen (2007) war

bereits ein Maximum der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen in der ersten Woche bei hypoxisch exponierten Mäusen gezeigt worden. In Übereinstimmung mit diesen Überlegungen wird der PDGF-Rezeptor β als Markerprotein für proliferationsfähige und in unterschiedliche Zellen differenzierbare Perizyten genutzt (Crisan et al. 2008).

Als weitere auf die Entwicklung der pulmonalen arteriellen Hypertonie und damit auch auf die Nestin-positiven-Zellen einwirkende Faktoren werden u.a. der Notch3-Rezeptor Signalweg (Li et al. 2009) und die Aktivierung von verschiedenen Subtypen der TRP (transient receptor potential)-Kanäle (Yang et al. 2010) angesehen. Es wird davon ausgegangen, dass der Notch-Rezeptor in die Kontrolle der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen und in die Aufrechterhaltung ihres undifferenzierten Status eingebunden ist (Li et al. 2009). Unterschiedliche TRP (transient receptor potential)-Kanäle, die zu den canoical (TRPC)-, melastin-related (TRPM)- und vanilloid-related (TRPV)-Subfamilien gehören, befinden sich in pulmonalen arteriellen glatten Gefäßmuskelzellen und reagieren mit einem spezifischen Ca^{2+} -vermittelten Signalweg auf verschiedene Stimuli, wie z.B. auf eine vorherige Ca^{2+} -Entladung, Rezeptor-Aktivierung, auf Sauerstoff, Wachstumsfaktoren und mechanischen Stress (Yang et al. 2010). Ob der Notch3-Rezeptor-Signalweg und die TRP-Kanäle einen Einfluss auf die Nestin-positive Subpopulation der glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in der Lunge besitzen, wurde bislang nicht untersucht und ist Ziel von zukünftigen Forschungen.

Die pulmonale Hypertonie kommt entweder in der idiopathischen Form vor oder ist kausal erklärbar. Dabei sind sekundäre Gefäßveränderungen mit pulmonaler Hypertonie viel häufiger als primäre Gefäßveränderungen zu beobachten. Die pulmonale Hypertonie kann als Folge von obstruktiven Lungenerkrankungen, wie Asthma bronchiale und der COPD, und von interstitiellen Lungenerkrankungen, wie der Lungenfibrose, Silikose, Sarkoidose und Gewebsneubildungen, entstehen (Simonneau et al. 2009). Es wird in erster Linie berichtet, dass ein Zusammenhang von pathologischen Veränderungen der Gefäßwände mit Krankheiten des Lungengewebes in der Weise vorliegt, dass z.B. interstitielle Lungenerkrankungen oder chronisch obstruktive Lungenerkrankungen eine Hypoxämie und einen erhöhten Widerstand in Gefäßen hervorrufen und somit sekundär eine pulmonale Hypertonie und eine Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen bewirken (Simonneau et al. 2009, Renz-Polster et al. 2004). Es wurde beobachtet, dass es bei der COPD zu einer Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen neben den bekannten Veränderungen der Luftwege kommt (Cao et al. 2005). Pulmona-

le Perizyten wurden mit der Entstehung des hellzelligen Lungentumors („clear cell tumor“ bzw. „sugar tumor“) in Verbindung gebracht (Lantuejoul et al. 1997).

Für die Reparatur des Lungengewebes werden in erster Linie Stammzellen verantwortlich gemacht, die sich im Respirationstrakt befinden. Dazu zählen z.B. duktale Zellen der submucosalen Drüsen der proximalen Trachea und verschiedene Clara-Zell-Typen (Roomans 2010). Des Weiteren werden Stammzellen beschrieben, die sich von anderen Geweben des Körpers ableiten, wie von embryonalen Stammzellen und vom Knochenmark (Roomans 2010, van Haaften et al. 2009). Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass von dem Knochenmark abstammende Zellen immunphenotypische und ultrastrukturelle Charakteristika von Alveolarepithelzellen Typ 2 aufwiesen (van Haaften et al. 2009).

Unsere Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die von uns charakterisierten Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten in den Gefäßwänden der Lunge in die Pathologie der pulmonalen Hypertonie mit eingebunden sind. Die Nestin-exprimierende Subpopulation der glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten ist zur Proliferation fähig und somit für die bei der pulmonalen Hypertonie vorliegende Verengung der Gefäße mitverantwortlich. Sie bietet durch die Charakterisierung von Nestin als differenzierungsfähige und proliferierende Zellen einen Angriffspunkt in der Therapie der pulmonalen Hypertonie.

5.3.3 Neuronale Charakteristika und Potential der Progenitorzellen in den Gefäßwänden der Lunge

Die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen von Lungengewebe mit Antikörpern gegen NG2, das neben der Expression in neuralen und Gliazellvorläuferzellen des zentralen und peripheren Nervensystems (Belachew et al. 2003) auch von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten sich entwickelnder Gefäße exprimiert wird (Ozerdem et al. 2001), und gegen das Intermediärfilamentprotein Neurofilament-H (NF-H), welches bekanntlich im Nervensystem während der Differenzierung von Stammzellen in die neuronale Linie in der Nachfolge von Nestin exprimiert wird (Dahlstrand et al. 1995, Cattaneo et al. 1990), zeigten bislang keine spezifische Färbung der glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten (Data not shown).

Allerdings demonstrieren die glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten der Lunge durch die Expression von Nestin-GFP, das unter der Kontrolle eines ZNS-spezifischen Enhancers steht,

ihre Verbindung zu neuronalen Vorläuferzellen. Im Hoden war gezeigt worden, dass diverse neuronale Marker wie GFAP, Neurofilament-H, growth-associated protein 43, Tyrosin Kinase A, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) und neural cell adhesion molecule (NCAM) von Gefäßwandzellen bzw. von den ihnen nachfolgenden Zellen, wie z.B. den Leydig-Zellen, exprimiert werden (Davidoff et al. 2004). De Ruiter et al. (1989) zeigen, dass Zellen der Neuralleiste zum pulmonalen Gefäßstrang beisteuern, was die Annahme von einer Verbindung zwischen Blutgefäßen und neuronalen Strukturen bestätigt (Carmeliet 2003, Korn et al. 2002).

Vor dem Hintergrund, dass kürzlich aus adulten neuronalen Stammzellen von der Maus pluripotente Stammzellen generiert werden konnten (Kim et al. 2009), ist der Gedanke der Isolierung von Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten und des Generierens einer Stammzelllinie aus diesen Zellen vorstellbar.

Unserer Vorstellung nach gibt es ein organübergreifendes System in Form von in Gefäßwänden ansässigen Progenitorzellen, die durch eine Nestin-Expression charakterisiert werden können. Die Progenitorzellen befinden sich in einem Ruhestadium und benötigen organspezifische Stimuli für ihre Aktivierung. Als Aktivierungsstimuli können im Hoden die Verminderung der Testosteronkonzentration (Davidoff et al. 2004) und in der Lunge chronische Hypoxie sowie die Applikation chemischer Substanzen wie Monocrotalin (MCT) angesprochen werden. Eine Aktivierung der in Gefäßwänden residierenden Progenitorzellen ist auch bei der Entwicklung des Hodens (Davidoff et al. 2004) und der Lunge beobachtet worden. Wir glauben, dass die spezielle Differenzierung von Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten somit zur Organentwicklung und –erhaltung beiträgt.

6 Zusammenfassung

Das Intermediärfilamentprotein Nestin wurde in neuronalen Stammzellen entdeckt und sein Vorkommen wurde ursprünglich nur neuronalem Gewebe zugesprochen. Aktuelle Berichte beschreiben eine Nestin-Expression auch außerhalb des ZNS und charakterisieren die Nestin-exprimierenden Zellen als organspezifische Vorläuferzellen. So konnten im Hoden Nestin-positive Vorläuferzellen identifiziert werden, die zu Testosteron-produzierenden Leydig-Zellen differenzierten. Anliegen dieser Arbeit waren der Nachweis und die Charakterisierung Nestin-exprimierender Zellen in der Lunge.

Es wurden morphologische Untersuchungen an Lungen von neugeborenen und adulten transgenen Nestin-GFP-Mäusen durchgeführt. Versuche mit anti-Nestin-Antikörpern dienten der Überprüfung der Spezifität des GFP-Signals. Die genaue zelluläre Lokalisation von Nestin wurde durch zusätzliche Verwendung von Endothelzell- (anti-CD31-Antikörper) und glatten Muskelzellmarkern (anti- α -smooth-muscle-actin-Antikörper) sichergestellt. Zur Abschätzung der Quantität der Nestin-Expression in Lungen von neugeborenen und adulten Mäusen wurden der Vergleich der Nestin-GFP-Schnitte sowie Western-Blot-Analysen herangezogen.

Es konnte eine eindeutige Lokalisation von Nestin-exprimierenden Zellen in der Vaskulatur der Lunge beobachtet werden. Nestin-positive Zellen befanden sich in arteriellen und in venösen Gefäßen sowie in Kapillaren. Demgegenüber zeigten die Anteile des Bronchialbaumes keine Nestin-exprimierenden Zellen. Eine klare Abgrenzung der CD31-markierten Endothelzellen von den Nestin-exprimierenden Zellen und eine Koexpression von Nestin-GFP und SMA in einem Teil der glatten Gefäßmuskelzellen konnten gezeigt werden. Daneben fanden sich auch Nestin-positive Zellen in den Kapillaren, bei denen es sich nicht um Endothelzellen handelt. Diese dürften als Perizyten anzusprechen sein. In der adulten Lunge macht die Subpopulation der Nestin-exprimierenden Zellen etwa 10% der glatten Gefäßmuskelzellen aus. Eine vielfach erhöhte Nestin-Expression in den neugeborenen Lungen im Vergleich zu adulten Lungen konnte festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Nestin-Expression in einer Subpopulation von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten der Lunge identifiziert, die am ehesten Progenitorzellen in pulmonalen Gefäßwänden darstellen. Das zeitgleiche Zusammenfallen der Nestin-Expression mit dem Maximum der postnatalen Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, das in dieser

Doktorarbeit nachfolgenden Studien unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, spricht für das Proliferationspotential der Nestin-positiven Zellen. Denkbar ist eine Beteiligung Nestin-positiver Zellen bei der postnatal stattfindenden vaskulären und extravaskulären pulmonalen Umstrukturierung, was die erhöhte Anzahl der Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und kapillären Zellen in der neugeborenen Lunge erklären würde. Daneben dürften Nestin-positive Zellen am vaskulären Remodelling bei der pulmonalen Hypertonie beteiligt sein, wofür neuste Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wesentliche Evidenzen liefern.

Somit trägt die vorliegende Arbeit mit der Identifikation von Nestin-exprimierenden glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten als mögliche Progenitorzellen in der Lunge zum Verständnis von Proliferations- und Differenzierungspotential der Gefäßwände bei, hilft beim Verstehen der Pathogenese der pulmonalen Hypertonie und bietet Möglichkeiten zur Eröffnung neuer Therapieansätze.

7 Summary

The intermediate filament protein nestin was first discovered in neuronal stem cells and originally, nestin-positive cells were thought to occur only in neuronal tissue. Recent data also describe nestin expression in non-neuronal tissues and characterize nestin-expressing cells as local precursor cells. In testis nestin-positive precursor cells could be identified which are able to differentiate into testosterone-producing Leydig-cells. Aims of this work were the identification and characterization of nestin-expressing cells in the lung.

GFP-fluorescence was examined in lungs of new-born and adult nestin-GFP-transgenic-mice. Experiments with anti-nestin antibodies were conducted to verify the specificity of the GFP-signal. The exact cellular localization of nestin was assured by the additional use of endothelial- (anti-CD31-antibody) and smooth muscle cell markers (anti- α -smooth-muscle-actin-antibody). To compare nestin expression in lungs of new-born and adult mice, nestin-GFP-sections and Western-blot analyses were used.

A distinct localization of nestin-expressing cells in lung vasculature could be observed. Nestin-positive cells were found both in arterial and venous vessels and in capillaries. On the other hand, components of the bronchial tree did not represent nestin-expressing cells in any case. CD31-marked endothelial cells did not show nestin expression, whereas nestin-GFP could be detected in a subpopulation of SMA-positive vascular smooth muscle cells. There are also nestin-positive cells in capillaries, which are not endothelial cells. These cells may represent pericytes. In the adult lung the subpopulation of nestin-expressing cells accounts for approximately 10% of the vascular smooth muscle cells. In new-born lungs, nestin expression was multiple higher than in adult ones.

Taken together, nestin expression was identified in a subpopulation of vascular smooth muscle cells and pericytes of the lung presumably representing progenitor cells in pulmonary vascular walls. Studies of our group, performed after the present investigation, could show that postnatal nestin expression is high when vascular smooth muscle cells proliferate; this fact suggests the proliferative capacity of these cells. It is possible that these presumed progenitor cells are able to differentiate into intra- and extra-vascular cells that are needed during postnatal pulmonary reorganization. This would explain the high number of nestin-expressing vascular smooth muscle cells and capillary cells at postnatal day 1 compared to the adult. An

involvement of nestin-positive cells in vascular remodeling in case of pulmonary hypertension is also conceivable as can be deduced by new data of our group.

By identifying nestin-expressing vascular smooth muscle cells and pericytes as possible progenitor cells in the lung, understanding of the mechanism of proliferation and differentiation of vascular wall cells in development and repair may increase. In addition, nestin-positive cells may represent new targets to establish therapeutic approaches in vascular remodeling.

8 Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman A, Rao MS, Shetty AK.** (2004) Nestin expression in hippocampal astrocytes after injury depends on the age of the hippocampus. *Glia* 47(4):299-313.
- About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA.** (2000) Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol* 157(1):287-95.
- Aihara M, Sugawara K, Torii S, Hosaka M, Kurihara H, Saito N, Takeuchi T.** (2004) Angiogenic endothelium-specific nestin expression is enhanced by the first intron of the nestin gene. *Lab Invest* 84(12):1581-92.
- Alliot F, Rutin J, Leenen PJ, Pessac B.** (1999) Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels coexpress aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res* 58(3):367-78.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD.** (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci* 2(4):287-93.
- Amoh Y, Yang M, Li L, Reynoso J, Bouvet M, Moossa AR, Katsuoaka K, Hoffman RM.** (2005) Nestin-linked green fluorescent protein transgenic nude mouse for imaging human tumor angiogenesis. *Cancer Res* 65(12):5352-7.
- Amy RWM, Bowes D, Burri PH, Haines J, Thurlbeck WM.** (1977) Postnatal growth of the mouse lung. *J Anat* 124(Pt 1):131-51.
- Badesch DB, McLaughlin VV, Delcroix M, Vizza CD, Olschewski H, Sitbon O, Barst RJ.** (2004) Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S):56S-61S.
- Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, Gallo V.** (2003) Postnatal NG2 proteoglykan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol* 161(1):169-86.
- Bennett LB, Cai J, Enikolopov G, Iacovitti L.** (2010) Heterotopically transplanted CVO neural stem cells generate neurons and migrate with SVZ cells in the adult mouse brain. *Neurosci Lett* 475(1):1-6.
- Bernardo AS, Barrow J, Hay CW, McCreath K, Kind AJ, Schnieke AE, Colman A, Hart AW, Docherty K.** (2006) Presence of endocrine and exocrine markers in EGFP-positive cells from the developing pancreas of a nestin/EGFP mouse. *Mol Cell Endocrinol* 253(1-2):14-21.
- Berndt C, Saboor F, Müller D, Middendorff R.** (2008) Nestin expression in lung vasculature. 25. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. Poster DOI 10.3337/anatges.2008.0007.
- Bertelli E, Regoli M, Fonzi L, Occhini R, Mannucci S, Ermini L, Toti P.** (2007) Nestin expression in adult and developing human kidney. *J Histochem Cytochem* 55(4):411-21.
- Bertelli E, Regoli M, Lucattelli M, Bastianini A, Fonzi L.** (2002) Nestin expression in rat adrenal gland. *Histochem Cell Biol* 117(4):371-7.
- Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, Mori T, Götz M.** (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(9):3581-6.
- Burri PH.** (1974). The postnatal growth of the rat lung. *Anat Rec* 180(1):77-98.
- Cao GQ, Qian GS, Lin L, Cui SH.** (2005) The changes of apoptosis and proliferation of pulmonary tissue in chronic obstructive pulmonary disease rats. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi* 28(3):169-72.

- Carmeliet P.** (2003) Blood vessels and nerves: common signals, pathways and diseases. *Nat Rev Genet* 4(9):710-20.
- Cattaneo E, McKay R.** (1990) Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 347(6295):762-5.
- Clarke SR, Shetty AK, Bradley JL, Turner DA.** (1994) Reactive astrocytes express the embryonic intermediate neurofilament nestin. *Neuroreport* 5(15):1885-8.
- Cornfield DN.** (2010) Developmental regulation of oxygen sensing and ion channels in the pulmonary vasculature. *Adv Exp Med Biol* 661:201-20.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriola G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B.** (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3(3):301-313.
- Dahlstrand J, Lardelli M, Lendahl U.** (1995) 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(1):109-129.
- D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT et al.** (1991) Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med* 115(5):343-9.
- Darland DC, D'Amore PA.** (2001) TGF beta is required for the formation of capillary-like structures in three-dimensional cocultures of 10T1/2 and endothelial cells. *Angiogenesis* 4(1):11-20.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB.** (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissue. *J Cell Sci* 119(Pt 11):2204-13.
- Davidoff MS, Middendorff R, Müller D, Holstein AF.** (2009) The neuroendocrine Leydig cells and their stem cell progenitors, the pericytes. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 205:1-107.
- Davidoff MS, Middendorff R, Enikolopov G, Riethmacher D, Holstein AF, Müller D.** (2004) Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J Cell Biol* 167(5):935-44.
- Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z.** (2007) Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 304(1):246-259.
- Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G.** (2007) Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9(3):255-67.
- de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot AC, Rammos S, Poelmann RE.** (1989) The special status of the pulmonary arch artery in the branchial arch system of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 179(4):319-25.
- Diaz-Flores L, Gutiérrez R, Madrid JF, Varela H, Valladares F, Acosta E, Martín-Vasallo P, Diaz-Flores L Jr.** (2009) Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* 24(7):909-69.

- Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, Grant ME, Canfield AE.** (1998) Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J Bone Miner Res* 13(5):828-838.
- Dony EMM.** (2009) Dualselektive Phosphodiesterase 3 und 4 Inhibition in experimenteller pulmonaler Hypertonie. Inauguraldissertation.
- Dore-Duffy P, Katychew A, Wang X, Van Buren E.** (2006) CNS microvascular pericytes exhibit multipotential stem cell activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 26(5):613-24.
- Drapeau J, El-Helou V, Clement R, Bel-Hadj S, Gosselin H, Trudeau LE, Villeneuve L, Calderone A.** (2005) Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J Cell Physiol* 204(1):51-62.
- Drenckhahn D.** (2004) Band 2. 16. Auflage. Benninghoff. München: Elsevier GmbH (Urban & Fischer Verlag). S.90.
- Duncker HR, Kummer W.** (2008) Band 1. 17. Auflage. Benninghoff. München: Elsevier GmbH (Urban & Fischer Verlag). S.539-542.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold CH, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE, Pekny M.** (1999) Intermediate filament protein partnership in astrocytes. *J Biol Chem* 274(34):23996-4006.
- Etchevers HC, Vincent C, Le Douarin NM, Couly GF.** (2001) The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and fore-brain. *Development* 128(7):1059-68.
- Farrington-Rock C, Crofts NJ, Doherty MJ, Ashton BA, Griffin-Jones C, Canfield AE.** (2004) Chondrogenic and adipogenic potential of microvascular pericytes. *Circulation* 110(15):2226-32.
- Flørenes VA, Holm R, Myklebost O, Lendahl U, Fodstad O.** (1994) Expression of the neuroectodermal intermediate filament nestin in human melanomas. *Cancer Res* 54(2):354-6.
- Frederiksen K, McKay RD.** (1988) Proliferation and differentiation of rat neuroepithelial precursor cells in vivo. *J Neurosci* 8(4):1144-51.
- Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR.** (2006) Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 168(2):659-69.
- Fröjdman K, Pelliniemi LJ, Lendahl U, Virtanen I, Eriksson JE.** (1997) The intermediate filament protein nestin occurs transiently in differentiating testis of rat and mouse. *Differentiation* 61(4): 243-9.
- Fuchs E, Cleveland DW.** (1998) A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 279(5350):514-9.
- Galiè N, Torbicki A, Barst R, Dartevelle P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G.** (2004) Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The task force on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension of the european society of cardiology. *Eur Heart J* 25(24):2243-78.
- Ghofrani HA, Wiedemann R, Rose F, Schermuly RT, Olschewski H, Weissmann N, Gunther A, Walmrath D, Seeger W, Grimminger F.** (2002) Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 360(9337):895-900.
- Gleiberman AS, Encinas JM, Mignone JL, Michurina T, Rosenfeld MG, Enikolopov G.** (2005) Expression of nestin-green fluorescent protein transgene marks oval cells in the adult liver. *Dev Dyn* 234(2):413-21.

- Goldman RD, Grin B, Mendez MG, Kuczmarski ER.** (2008) Intermediate filaments: versatile building blocks of cell structure. *Curr Opin Cell Biol* 20(1):28-34.
- Golpon HA, Welte T, Hoepfer MM.** (2005) Pulmonary arterial hypertension: pathobiology, diagnosis and treatment. *Minerva med* 96(4):303-14.
- Golpon HA, Hoepfer MM, Welte T.** (2004) Klassifikation der pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie* 1:77-82.
- Grimminger F, Schermuly RT.** (2010) PDGF receptor and its antagonists: role in treatment of PAH. *Adv Exp Med Biol* 661:435-46.
- Haworth SG.** (1995) Development of the normal and hypertensive pulmonary vasculature. *Exp Physiol* 80(5):843-53.
- Haworth SG, Hall SM, Chew M, Allen K.** (1987) Thinning of fetal pulmonary arterial wall and postnatal remodelling: ultrastructural studies on the respiratory unit arteries of the pig. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 411(2): 161-171.
- Hayden MR, Karuparthi PR, Habibi J, Lastra G, Patel K, Wasekar C, Manrique CM, Ozerdem U, Stas S, Sowers JR.** (2008) Ultrastructure of islet microcirculation, pericytes and the islet exocrine interface in the HIP rat model of diabetes. *Exp Biol Med* (Maywood) 233(9):1109-23.
- Hayden MR, Karuparthi PR, Habibi J, Wasekar C, Lastra G, Manrique C, Stas S, Sowers JR.** (2007) Ultrastructural islet study of early fibrosis in the Ren2 rat model of hypertension. Emerging role of the islet pancreatic pericyte-stellate cell. *JOP* 8(6):725-38.
- Herold.** (2007) *Innere Medizin*. Köln: Dr. med. Gerd Herold. S.361-364.
- Hislop A, Reid L.** (1973) Pulmonary arterial development during childhood: branching pattern and structure. *Thorax* 28(2):129-35.
- Hislop A, Reid L.** (1972) Intra-pulmonary arterial development during fetal life – branching pattern and structure. *J Anat* 113(Pt 1): 35-48.
- Hockfield S, McKay RD.** (1985) Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci* 5(12):3310-28.
- Hsieh J, Eisch AJ.** (2010) Epigenetics, hippocampal neurogenesis, and neuropsychiatric disorders: unraveling the genome to understand the mind. *Neurobiol Dis* 39(1):73-84.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M.** (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S):13S-24S.
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA.** (2006) Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(35):13198-202.
- Jostarndt-Fögen K, Djonov V, Draeger A.** (1998) Expression of smooth muscle markers in the developing murine lung: potential contractile properties and lineal descent. *Histochem Cell Biol* 110(3):273-84.
- Kim HS, Kang HS, Messam CA, Min KW, Park CS.** (2002) Comparative evaluation of angiogenesis in gastric adenocarcinoma by nestin and CD34. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 10(2):121-7.
- Kim JB, Zaehres H, Araújo-Bravo MJ, Schöler HR.** (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells. *Nat Protoc* 4(10):1464-70.
- Klein T, Ling Z, Heimberg H, Madsen OD, Heller RS, Serup P.** (2003) Nestin is expressed in vascular endothelial cells in the adult human pancreas. *J Histochem Cytochem* 51(6):697-706.

- Kobayashi M, Sjöberg G, Söderhäll S, Lendahl U, Sandstedt B, Sejersen T.** (1998) Pediatric rhabdomyosarcomas express the intermediate filament nestin. *Pediatr Res* 43(3):386-92.
- Korn J, Christ B, Kurz H.** (2002) Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells. *J Comp Neurol* 442(1):78-88.
- Kovacic JC, Boehm M.** (2009) Resident vascular progenitor cells: an emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology. *Stem Cell Res* 2(1):2-15.
- Lammert E, Cleaver O, Melton D.** (2001) Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 294(5542):564-7.
- Lantuejoul S, Isaac S, Pinel N, Negoescu A, Guibert B, Brambilla E.** (1997) Clear cell tumor of the lung: an immunohistochemical and ultrastructural study supporting a pericytic differentiation. *Mod Pathol* 10(10):1001-8.
- Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD.** (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60(4):585-95.
- Leonard DG, Gorham JD, Cole P, Greene LA, Ziff EB.** (1988) A nerve growth factor-regulated messenger RNA encodes a new intermediate filament protein. *J Cell Biol* 106(1):181-93.
- Li X, Zhang X, Leathers R, Makino A, Huang C, Parsa P, Macias J, Yuan JXY, Jamieson SW, Thistlethwaite PA.** (2009) Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* 15(11):1289-97.
- Lothian C, Lendahl U.** (1997) An evolutionarily conserved region in the second intron of the human nestin gene directs gene expression to CNS progenitor cells and to early neural crest cells. *Eur J Neurosci* 9(3):452-62.
- Magin TM, Reichelt J, Hatzfeld M.** (2004) Emerging functions: diseases and animal models reshape our view of the cytoskeleton. *Exp Cell Res* 301(1):91-102.
- Massaro D, Teich N, Maxwell S, Massaro GD, Whitney P.** (1985) Postnatal development of alveoli. Regulation and evidence for a critical period in rats. *J Clin Invest* 76(4):1297-305.
- Mignone JL, Kukekov V, Chiang AS, Steindler D, Enikolopov G.** (2004) Neural stem and progenitor cells in nestin-GFP transgenic mice. *J Comp Neurol* 469(3):311-24.
- Mokry J, Cizkova D, Filip S, Ehrmann J, Österreicher J, Kolar Z, English D.** (2004) Nestin expression by newly formed human blood vessels. *Stem Cells Dev* 13(6):658-664.
- Moore KL, Persaud TVN.** (2007) 5. Auflage. *Embryologie*. München: Elsevier GmbH (Urban & Fischer Verlag). S.273-275.
- Moore KL.** (1996) 2. Auflage. *Grundlagen der medizinischen Embryologie*. Stuttgart: Enke. S.94, S.96.
- Müller D, Hida B, Guidone G, Speth RC, Michurina TV, Enikolopov G, Middendorff R.** (2009) Expression of guanylyl cyclase (GC)-A and GC-B during brain development: evidence for a role of GC-B in perinatal neurogenesis. *Endocrinology* 150(12):5520-9.
- Müller SM, Stolt CC, Terszowski G, Blum C, Amagai T, Kessar N, Iannarelli P, Richardson WD, Wegner M, Rodewald HR.** (2008) Neural crest origin of perivascular mesenchyme in the adult thymus. *J Immunol* 180(8):5344-51.
- Naeye RL.** (1961) Arterial changes during the perinatal period. *Arch Pathol* 71:121-8.
- Ni A, Lashnits E, Yao LC, Baluk P, McDonald DM.** (2010) Rapid remodeling of airway vascular architecture at birth. *Dev Dyn* 239:2354-2366.

- Oikawa H, Hayashi K, Maesawa C, Masuda T, Sobue K.** (2010) Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316(6):940-50.
- Olschewski H, Hoepfer MM, Borst MM, Ewert R, Grünig E, Kleber FX, Kopp B, Opitz C, Reichenberger F, Schmeisser A, Schranz D, Schulze-Neick I, Wilkens H, Winkler J, Worth H.** (2006) Diagnostik und Therapie der chronischen pulmonalen Hypertonie. *Pneumologie* 60:749-771.
- Olschewski H, Simonneau G, Galiè N, Higenbottom T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoepfer MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W.** (2002) Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 347(5):322-9.
- O’Rahilly R, Müller F.** (1999) 1. Auflage. *Embryologie und Teratologie des Menschen*. Bern: Verlag Hans Huber. S.282/283.
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR.** (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84(3):767-801.
- Ozderdem U, Alitalo K, Salven P, Li A.** (2005) Contribution of bone marrow-derived pericyte precursors cells to corneal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(10):3502-6.
- Ozderdem U, Grako KA, Dahlin-Huppe K, Monosov E, Stallcup WB.** (2001) NG2 proteoglykan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev Dyn* 222(2):218-27.
- Pacilli A, Pasquinelli G.** (2009) Vascular wall resident progenitor cells: a review. *Exp Cell Res* 315(6):901-14.
- Paddenberg R, Stieger P, von Lilien AL, Faulhammer P, Goldenberg A, Tillmanns HH, Kummer W, Braun-Dullaeus RC.** (2007) Rapamycin attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy in mice. *Respir Res* 8:15.
- Paddenberg R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, Kummer W.** (2006) Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices. *Respir Res* 7:93.
- Prosser IW, Stenmark KR, Suthar M, Crouch EC, Mecham RP, Parks WC.** (1989) Regional heterogeneity of elastin und collagen gene expression in intralobar arteries in response to hypoxic pulmonary hypertension as demonstrated by in situ hybridization. *Am J Pathol* 135(6):1073-88.
- Rajantie I, Ilmonen M, Alminaita A, Ozderdem U, Alitalo K, Salven P.** (2004) Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 104(7):2084-6.
- Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J.** (2004) 3. Auflage. *Basislehrbuch Innere Medizin*. München: Elsevier GmbH (Urban & Fischer Verlag). S.478, 491.
- Roomans GM.** (2010) Tissue engineering and the use of stem/progenitor cells for airway epithelium repair. *Eur Cell Mater* 19:284-99.
- Rubin LJ, Badesch DB, Barst RJ, Galiè N, Black CM, Keogh A, Pulido T, Frost A, Roux S, Leconte I, Landzberg M, Simonneau G.** (2002) Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 346(12):896-903.
- Runo JR, Loyd JE.** (2003) Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 361(9368):1533-44.
- Saboer F, Berndt C, Müller D, Middendorff R.** (2009) Characterization of progenitor cells in pulmonary vasculature. 26. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg. Poster DOI 10.3337/anatges.2010.0012.

- Sahlgren CM, Pallari HM, He T, Chou YH, Goldman RD, Eriksson JE.** (2006) A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J* 25(20):4808-19.
- Sainz J, Al Haj Zen A, Caligiuri G, Demerens C, Urbain D, Lemitre M, Lafont A.** (2006) Isolation of “side population” progenitor cells from healthy arteries of adult mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(2):281-6.
- Sawamoto K, Nakao N, Kakishita K, Ogawa Y, Toyama Y, Yamamoto A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Itakura T, Okano H.** (2001) Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci* 21(11):3895-903.
- Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F.** (2005) Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 115(10):2811-21.
- Schiebler TH, Schmidt W.** (2002) 8. Auflage. *Anatomie*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. S.493.
- Shepro D, Morel NML.** (1993) Pericyte physiology. *FASEB J* 7(11):1031-8.
- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliot CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R.** (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl):S43-54.
- Stenmark KR, Frid MG.** (1998) Smooth muscle cell heterogeneity: role of specific smooth muscle cell subpopulations in pulmonary vascular disease. *Chest* 114(1 Suppl): 82S-90S.
- Sugawara K, Kurihara H, Negishi M, Saito N, Nakazato Y, Sasaki T, Takeuchi T.** (2002) Nestin as a marker for proliferative endothelium in gliomas. *Lab Invest* 82(3):345-51.
- Teranishi N, Naito Z, Ishiwata T, Tanaka N, Furukawa K, Seya T, Shinji S, Tajiri T.** (2007) Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int J Oncol* 30(3):593-603.
- Thurlbeck WM.** (1975) Postnatal growth and development of the lung. *Am Rev Respir Dis* 111(6):803-44.
- Tsujimura T, Makiishi-Shimobayashi C, Lundkvist J, Lendahl U, Nakasho K, Sugihara A, Iwasaki T, Mano M, Yamada N, Yamashita K, Toyosaka A, Terada N.** (2001) Expression of the intermediate filament nestin in gastrointestinal stromal tumors and interstitial cells of Cajal. *Am J Pathol* 158(3):817-823.
- van Haaften T, Byrne R, Bonnet S, Rochefort GY, Akabuta J, Bouchentouf M, Rey-Parra GJ, Galipeau, Haromy A, Eaton F, Chen M, Hashimoto K, Abley D, Korbitt G, Archer SL, Thébaud B.** (2009) Airway delivery of mesenchymal stem cells prevents arrested alveolar growth in neonatal lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 180(11):1131-42.
- Wiese C, Rolletschek A, Kania G, Blyszczuk P, Tarasov KV, Tarasova Y, Wersto RP, Boheler KR, Wobus AM.** (2004) Nestin expression – a property of multi-lineage progenitor cells? *Cell Mol Life Sci* 61(19-20):2510-22.
- Wohrley JD, Frid MG, Moiseeva EP, Orton EC, Belknap JK, Stenmark KR.** (1995) Hypoxia selectively induces proliferation in a specific subpopulation of smooth muscle cells in the bovine neonatal pulmonary arterial media. *J Clin Invest* 96(1):273-81.
- Xu WP, Shan LD, Gong S, Chen L, Zhang YL, Yin QZ, Hisamitsu T, Jiang XH, Guo SY.** (2006) Forced running enhances neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult rats and improves learning ability. *Sheng Li Xue Bao* 58(5):415-20.

- Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K.** (2000) Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport* 11(9):1991-6.
- Yang J, Bian W, Gao X, Chen L, Jing N.** (2000) Nestin expression during mouse eye and lens development. *Mech Dev* 94(1-2):287-91.
- Yang XR, Lin MJ, Sham JS.** (2010) Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 661:109-22.
- Young HM, Ciampoli D, Southwell BR, Newgreen DF.** (1996) Origin of interstitial cells of Cajal in the mouse intestine. *Dev Biol* 180(1):97-107.
- Yuan JXJ, Rubin LJ.** (2005) Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. *Circulations* 111(5):534-8.
- Zengin E, Chalajour F, Gehling UM, Ito WD, Treede H, Lauke H, Weil J, Reichen-spurner H, Kilic N, Ergün S.** (2006) Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis. *Development* 133(8):1543-51.
- Zimmerman L, Parr B, Lendahl U, Cunningham M, McKay R, Gavin B, Mann J, Vas-sileva G, McMahon A.** (1994) Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* 12(1):11-24.

9 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

Unterschrift:

10 Danksagung

Zuerst möchte ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Ralf Middendorff für seine ausgesprochen gute Betreuung, seine kontinuierliche Unterstützung und Mühe beim Fertigstellen dieser Arbeit bedanken. In allen Phasen der Doktorarbeit, der Versuchsplanung, der Ausführung und dem Schreiben, stand er mir immer hilfsbereit, motivierend sowie stets freundlich zur Seite.

Allen Mitarbeitern der AG Signaltransduktion möchte ich für die zu jeder Zeit vorhandene Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie die kulinarischen Genüsse meinen Dank aussprechen; ich habe mich immer sehr wohl und gut betreut gefühlt. Im Besonderen geht mein Dank an Sabine Tasch für die Präparation der Tiere und als immer freundliche und kompetente Ansprechpartnerin in allen Fragen zur Laborarbeit. Ebenfalls danke ich Dr. Dieter Müller für die Unterstützung bei der Auswertung der Western-Blot-Analysen. Bei Farhan Saboor bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und das Weiterführen der Thematik dieser Arbeit.

Danken möchte ich Frau Dr. Gabriela Krasteva für ihre Hilfe bei dem Erstellen der konfokalen Bilder.

Natürlich danke ich auch meiner Familie und meinem Freund für ihre Unterstützung.