

Aus der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie
(Prof. Dr. med. G. A. Müller)
im Zentrum Innere Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Regenerationspotenzial CD133⁺-hämatopoetischer
Progenitorzellen der humanen Nabelschnur
beim Nierendefekt im Mausmodell**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Birgit Hoffschulte

aus

Meppen

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. G. A. Müller

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung in das Thema.....	1
1.2	Aufbau und Funktionen des Tubulussystems	2
1.3	Das Tamm-Horsfall-Protein	5
1.4	Vorstellung bisher angewandter Modelle in der Stammzellforschung.....	6
1.5	Neuer Aspekt: Xenotransplantation Mensch-Maus	7
1.6	Stammzellen	7
1.6.1	Allgemeines zu Stammzellen.....	7
1.6.2	Embryonale Stammzellen.....	10
1.6.3	Adulte Stammzellen.....	11
1.6.4	Nabelschnurblut als jüngste Quelle adulter hämatopoetischer Stammzellen	12
1.6.5	Spermatogoniale Stammzellen.....	13
1.7	Das Prinzip der epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung	14
1.8	Schädigung durch das Ischämie/Reperfusion-Modell	15
1.9	Medikamentös-toxische Variante der Nierenschädigung am Beispiel des Antimykotikums Amphotericin B	18
1.10	Ziel der Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Plastikwaren.....	19
2.1.2	Glaswaren	20
2.1.3	Gerätschaften.....	20
2.1.4	Lösungen, Puffer, Chemikalien	21
2.1.5	Primer	26
2.1.6	Antikörper, Färbungen.....	26
2.1.7	Medikamente	27
2.1.8	Tiere	27
2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Isolation humaner Lymphozyten aus Nabelschnurvollblut mittels Dichtegradienten- zentrifugation	28
2.2.2	Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)	29
2.2.3	Trypsinierung der Zellen.....	30
2.2.4	Transplantation	31
2.2.5	Genehmigung der Versuche an lebenden Tieren.....	35
2.2.6	Laser-Scanning-Zytometrie	35
2.2.7	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)	38
2.2.8	Fluoreszenzfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie	40
2.2.9	Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten hypoxisch geschädigter muriner Nieren	42
2.2.10	Gewinnung humaner RNA mittels Laser-Mikrodissektion	43
2.2.11	RNA-Isolation mit dem <i>Invisorb</i> ® <i>RNA-Kit I</i> der Firma Invitex	43

2.2.12	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit dem <i>Qiagen® OneStep-RT-PCR-Kit</i>	44
2.2.13	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.2.14	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	46
3	Ergebnisse	49
3.1	Durchflusszytometrische Analyse der Reinheit per MACS selektierter CD133 ⁺ -Progenitorzellen.....	49
3.2	Auswertung der Reinheit von CD133 ⁺ -Progenitorzellen durch Laser-Scanning-Zytometrie als additives Verfahren zur Durchflusszytometrie	52
3.3	Differenzierung von Stammzellen in Kultur bei 37°C.....	53
3.4	Ausmaß der murinen Nierenschädigung nach Ischämie/Reperfusion.....	55
3.5	Fluoreszenzmikroskopische Detektion HLA-positiver Tubulusareale in murinen Nieren.....	56
3.6	Auswertung der Agarose-Gelaufreinigung	59
3.7	Analyse der FISH-Signale in murinen Nieren durch Fluoreszenzmikroskopie und Laser-Scanning-Zytometrie	61
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse	63
4	Diskussion	64
4.1	Forschung mit Stammzellen.....	64
4.2	Bisherige Arbeiten über die Anwendung hämatopoetischer Stammzellen bezüglich der Nierenregeneration nach Ischämie - eine kritische Betrachtung.....	67
4.3	Einordnung dieser Dissertation in den Kontext der kurativen Anwendung hämatopoetischer Stammzellen nach Schädigung der Niere durch das Ischämie/Reperfusions-Modell.....	71
4.4	Intrarenale Stammzellen als Quelle endogener Nierenregeneration	72
4.5	Ischämie/Reperfusions-Modell versus andere Schädigungsverfahren der Niere	74
4.5.1	Ischämie/Reperfusions-Modell.....	74
4.5.2	Weitere renale Schädigungsmodelle - Beispiele der medikamentös-toxischen Varianten.....	76
4.6	Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)	78
4.7	Fluoreszenzfärbung	79
4.8	Gewinnung humaner RNA mittels Laser-Mikrodissektion	80
4.9	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	81
4.10	Beurteilung der Laser-Scanning-Zytometrie	82
4.11	Blick in die Zukunft	84
5	Zusammenfassung	86
6	Literaturverzeichnis	88

1 Einleitung

1.1 Einführung in das Thema

Dem Gebiet der Stammzelltherapie wird in der medizinischen und biologischen Forschung große Aufmerksamkeit geschenkt. Recht vielversprechende Erfolge in den noch jungen Anfängen der Stammzellforschung machen sie zunehmend zum Hoffnungsträger in der Medizin. Stammzellen sind bereits intensiv auf ihre Merkmale und Eigenschaften hin untersucht worden. Doch je mehr Ergebnisse aufgezeigt werden, desto umfangreichere Fragen schließen sich an, die nach Antworten verlangen und wissenschaftliches Denken weiterentwickeln.

Die vorliegende Dissertation befasst sich anhand eines Xenotransplantationsmodelles Mensch-Maus mit dem Einsatz CD133-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen - gewonnen aus humanem Nabelschnurblut - als mögliche zukünftige Therapieoption bei Nierenerkrankungen.

Bereits weitreichende Erfolge sind für den Einsatz von Stammzellen bei verschiedenen Organerkrankungen wie Leukämien (Lang et al. 2004; Markiewicz et al. 2004; Langer et al. 2003), einem Myokardinfarkt (Boyle et al. 2006; Orlic et al. 2003; Kocher et al. 2001), einem Diabetes mellitus (Assady et al. 2001), einem Morbus Crohn (Kreisel et al. 2003), der Parkinsonerkrankung (Isacson et al. 2003; Isacson 2002), Lebererkrankungen (Lagasse et al. 2000) sowie bei Lungenerkrankungen (Loebinger et al. 2008; Sueblinvong et al. 2008; Loebinger und Janes 2007) beschrieben worden. Bei Nierenerkrankungen sind diese Erfolge hingegen noch rudimentär.

Beispielhaft für erfolgreiche Stammzelltransplantationen seien Studien (Steinhoff 2006; Stamm et al. 2003; Strauer et al. 2001) über die Verwendung von Stammzellen bei Herzerkrankungen näher ausgeführt:

Im März 2001 transplantierten erstmalig Düsseldorfer Kardiologen einem 46-jährigen Patienten mit großem Vorderwandinfarkt autologe Knochenmarkstammzellen mit Hilfe einer Ballondilatation in die verschlossene Koronararterie, woraufhin sich die Herzleistung in Folge einer Neubildung von Herzmuskelgewebe deutlich erholte.

Es ist bei dieser Operation wichtig, die Stammzellen in die Randzone zwischen gesundem Gewebe und Infarktareal zu platzieren, da dieser Bereich eine etwa viermal höhere Zellerneuerungsrate als das normale Herzmuskelgewebe aufweist (Strauer et al. 2001).

Im Juli 2001 folgte dann durch Rostocker Kardiologen die weltweit erste Injektion von körpereigenen Knochenmarkstammzellen unmittelbar in infarziertes Myokardgewebe (Steinhoff 2006; Stamm et al. 2003).

Mittlerweile können weitere Forschungsgruppen dieses bemerkenswerte Ergebnis bestätigen (Pompilio et al. 2004). Die Stammzellen werden ebenso entweder nach einem Herzinfarkt in die Infarktarterie gespritzt oder im Rahmen einer Bypass-Operation direkt in das Myokard transplantiert. In vielen Fällen bessern sich Durchblutung und Herzfunktion. Vermutet wird neben der Regeneration des geschädigten Myokardgewebes auch eine Neoangiogenese (Cho et al. 2006; Tse et al. 2003). Dennoch sind weitere erfolgreiche Studien Voraussetzung dafür, diese noch experimentellen Behandlungsversuche im Klinikalltag zu verankern.

Untersuchungsschwerpunkt dieser Dissertation ist die Frage, ob der Einsatz bestimmter Stammzellen auch zur Regeneration von Nierenschäden beitragen kann.

Bei vielen Nierenerkrankungen im terminalen Stadium ist als letzte Therapieinstanz nur noch die Möglichkeit einer Dialyse oder Organtransplantation gegeben. Das Nierengewebe ist meist schon irreversibel geschädigt, sodass eine physiologische - niereneigene - Ausheilung nicht mehr möglich ist. Vor allem die Nierentubuli, im Speziellen die proximalen, reagieren aufgrund ihres Stoffwechsels und ihrer komplexen Funktionsweise sehr sensibel auf schädigende Reize (Bellini et al. 2007; Bonventre und Weinberg 2003). Daher ist besonders die Regenerationsfähigkeit von Tubuluszellen von klinischer Relevanz.

1.2 Aufbau und Funktionen des Tubulussystems

Im Folgenden wird der Aufbau des Tubulussystems beschrieben, der Gesamtaufbau sowie die Aufgaben der Niere werden dabei als bekannt vorausgesetzt. Ein Tubulus lässt sich in vier Bereiche gliedern, nämlich in:

- einen proximalen Tubulus mit einer Pars convoluta im Rindengewebe und einer Pars recta, bereits in den Markpyramiden gelegen.
- einen dünneren intermediären Tubulus mit einer Pars ascendens und einer Pars descendens.
- einen distalen Tubulus mit einer Pars recta und einer Pars convoluta, welche sich wieder im Cortex befindet.

- einen Verbindungstubulus, welcher die Pars convoluta des distalen 'Tubulus' mit dem Sammelrohr verbindet.

Die Partes rectae des proximalen und des distalen Tubulusabschnittes sowie der intermediäre Tubulus werden als Henle-Schleife zusammengefasst (benannt nach ihrem Entdecker Friedrich Gustav Jakob Henle, 1809-1885).

Die Arteria renalis teilt sich im Bereich des Hilus in zwei Äste auf (Ramus anterior und Ramus posterior). Aus dem Ramus anterior gehen wiederum vier Segmentarterien hervor. Der Ramus posterior versorgt ein Segment der Nierenhinterseite. Demnach sind in der Niere aufgrund ihrer Blutversorgung insgesamt fünf Nierenkompartimente differenzierbar.

Aufgabe des Tubulussystems ist zum einen die Reabsorption von etwa 99% des filtrierte Wassers, eines ähnlich großen Anteils der darin gelösten Elektrolyte und sämtlicher Zucker, Aminosäuren und Proteine des Primärharns sowie zum anderen die konzentrierte Exkretion (1-1½ l/Tag) von harnpflichtigen Substanzen, beispielsweise von stickstoffhaltigen Stoffwechselabbauprodukten oder Medikamenten.

Im proximalen Convolut finden die umfangreichsten Resorptionsleistungen bei unveränderter osmotischer Konzentration statt. Zwei Drittel des filtrierte Wassers und wichtige Bausteine des Körpers werden bereits nahezu vollständig rückresorbiert (Greger 2000).

Durch die sich anschließende Henle-Schleife wird ein osmotischer Gradient im Nierenmark aufgebaut. Dieser ist Voraussetzung dafür, dass im Endharn eine hohe osmotische Konzentration erreicht werden kann (Greger 2000). Sie wird durch einen aktiven Salztransport aus dem Tubuluslumen ins Gewebe bei fehlender Wasserpermeabilität aufgebaut (Kurbel et al. 2002; Kondo et al. 1992; Moore und Marsh 1980). Im distalen Tubulus findet die Feinabstimmung des Wasser- und Salzhaushaltes unter der Kontrolle von Aldosteron und antidiuretischem Hormon (ADH) statt (Kwon TH et al. 2005). Im weiteren Verlauf münden die Tubuli mehrerer Nephrone über Verbindungstubuli in ein Sammelrohr, in welchem die Harnosmolarität unter ADH-Kontrolle endgültig eingestellt wird (Fenton und Knepper 2007; Greger 2000; Stephenson 1983). ADH führt zum Einbau sogenannter Aquaporine in die Zellmembran (Kruse et al. 2006).

Im Bereich des distalen 'Tubulus', der den Glomerulus unmittelbar umgibt, verändert sich das Tubulusepithel zu besonders hohen, kernreichen Zellen. Die Zellen der Media des Vas afferens sind in dieser Kontaktzone epitheloid modifiziert und auf die Produktion von Renin spezialisiert. Dazwischen liegen sogenannte Polkissen. Bezeichnet wird dieser gesamte Bereich als juxtaglomerulärer Apparat.

Über ihn erfolgt die Regulierung der glomerulären Filtrationsrate jedes einzelnen Nephrons (Blantz und Deng 2007; Castrop 2007).

Um ihre Aufgaben zu erfüllen, bedient sich die Niere verschiedener Transportmechanismen. Epithelzellen sind polare Zellen: Der Aufbau der luminal gelegenen Membran unterscheidet sich funktionell wesentlich von dem der basolateralen Membran. Zur Vergrößerung ihrer Resorptionsfläche besitzen die Zellen des proximalen Tubulus' lumenseitig einen hohen Bürstensaum, genannt Mikrovilli, und basolateral tiefe Einfaltungen (basolaterales Labyrinth). Letztere stehen in Kontakt mit den zellulären Mitochondrien, welche ATP für die basolateral lokalisierte Na-K-ATPase generieren. Da den proximalen Tubuluszellen der größte Anteil an den Resorptionsprozessen obliegt, nimmt die Ausstattung der Zellen mit Mikrovilli nach distal des Tubulussystems hin ab.

Energieförderer für die meisten Transporter ist die erwähnte Na-K-ATPase (Skou und Esmann 1992). Drei Natrium-Kationen werden primär-aktiv - unter direktem ATP-Verbrauch - aus der Zelle ins Blut und zwei Kalium-Kationen in Gegenrichtung transportiert. Hierdurch werden zwei Triebkräfte für den Transport zahlreicher Stoffe, inklusive von Natrium und Kalium selbst, erzeugt. Zum einen ein chemischer Gradient, da das extrazelluläre Natrium das intrazelluläre überwiegt, zum anderen ein elektrisches Gefälle mit einem negativen Membranpotenzial, da intrazellulär mehr Kalium vorhanden ist als extrazellulär. An dieses elektrochemische Gefälle sind weitere Transporte gekoppelt, so kann zum Beispiel Glukose sekundär-aktiv (die Energie hierfür wird aus dem Natrium-Kalium-Gradienten gewonnen) zusammen mit den Natrium-Kationen mittransportiert werden. Andererseits können Harnstoff-Ionen in Gegenrichtung zu den Natrium-Kationen ins Tubuluslumen ebenfalls sekundär-aktiv sezerniert werden. Durch diese aktiven Transportvorgänge entsteht ein osmotisches Gefälle, sodass Wasser parazellulär passiv nachströmt und darüber hinaus noch gelöste Stoffe mit sich reißt (sogenannter "solvent drag") (Pohl und Saparov 2000; Hill und Shachar-Hill 1993). Dieser Mechanismus wiederum führt zu einer Konzentrierung anderer gelöster Stoffe im Tubulus, die entsprechend ihrem Konzentrationsgefälle passiv - ohne Energieaufwand - resorbiert werden (zum Beispiel Chlorid-Ionen).

Einfluss auf den Transport haben zudem die Molekülgröße, da kleinere Moleküle leichter diffundieren können, sowie die Form der Elektrolyte; nichtionisiert und somit lipidlöslich können diese die Membran besser passieren. Der Harn-pH-Wert hat demnach auch entscheidenden Einfluss auf die passive Resorptionsleistung.

Für den parazellulären Transport ist die Dichtigkeit der Schlussleisten (tight junctions, Zonula occludens) bestimmend (Kiuchi-Saishin et al. 2002; Simon et al. 1999). Während proximaler Tubulus

und dünner Teil der Henle-Schleife relativ durchlässig sind, sind die Schlussleisten des dicken aufsteigenden Teiles und der sich anschließenden Tubulusabschnitte relativ dicht und damit undurchlässig.

Diese Ausführungen verdeutlichen, dass die Transportvorgänge in der Niere ein komplexes Geschehen darstellen und in den verschiedenen Tubulusbereichen jeweils bestimmte Transportmechanismen überwiegen oder auch gar nicht vorhanden sind. Somit können sich schädigende Einflüsse auf die Nierenstrukturen unterschiedlich auswirken.

1.3 Das Tamm-Horsfall-Protein

Eine wichtige Rolle für die Nierengesundheit nimmt das Tamm-Horsfall-Protein (TH-Protein) ein. Es wurde im Jahr 1950 von den amerikanischen Virologen Igor Tamm und Frank Horsfall entdeckt. Gebildet wird es im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife sowie im frühen Teil des distalen Convoluts (Chakraborty et al. 2004). Das Molekulargewicht des Glykoproteins beträgt etwa 90 kDa (Devuyst et al. 2005).

Forscher können eine immunmodulatorische Funktion bei der Abwehr von Harnwegsinfekten (Säemann et al. 2005) sowie eine protektive Wirkung bei der Entstehung von Calcium-Oxalat-Steinen mit der Folge einer Nephrolithiasis aufzeigen (Mo et al. 2004).

Patienten mit einer Nierenschädigung, wie sie beispielsweise im Rahmen eines Diabetes mellitus auftreten kann, weisen geringere Mengen an TH-Protein als gesunde Menschen auf (Chakraborty et al. 2004).

Darüber hinaus scheinen genetisch bedingte renale Erkrankungen, wie zum Beispiel die medulläre Nierenzystenerkrankung Typ 2 (medullary cystic kidney disease 2, MCKD2) oder die familiäre juvenile hyperurikämische Nephropathie (familial juvenile hyperuricemic nephropathy, FJHN), durch Mutationen im TH-Protein bedingt zu sein (Weichhart et al. 2005).

Die vollständige Entschlüsselung der Funktionen des TH-Proteins steht weiterhin aus.

1.4 Vorstellung bisher angewandter Modelle in der Stammzellforschung

Akute oder chronische Nierenerkrankungen wie Glomerulonephritiden, tubulointerstitielle Nierenerkrankungen, Systemerkrankungen mit Nierenbeteiligung oder erblich bedingte Erkrankungen gehen unbehandelt häufig mit einer Niereninsuffizienz einher (Takeuchi 2007).

In Tiermodellen ist bereits untersucht worden, ob es außer Dialyse und Transplantation noch weitere, alternative Möglichkeiten der Behandlung gibt. Fragestellung ist dabei, inwieweit Stammzellen, seien sie organspezifischen oder extrarenalen Ursprungs, geschädigtes Nierengewebe zu regenerieren vermögen. Alle bisherigen Arbeiten sind dabei ausschließlich im Maus- oder Rattenmodell durchgeführt worden. Es existieren bisher keine publizierten Daten zu Xenotransplantationen von humanen Stammzellen - insbesondere von CD133-positiven Progenitorzellen - der Nabelschnur in Mausmodellen im Kontext der Nierenregeneration.

Nachfolgend werden die bisher angewandten Modelle mit ihren jeweiligen Ergebnissen kurz vorgestellt. Als erstes werden Publikationen genannt, die sich auf die Regeneration von Nierenglomeruli beziehen. Als zweites werden diejenigen Veröffentlichungen erwähnt, die ihren Blickpunkt auf die Regeneration von Nierentubuli richten.

In einem Maus-Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass hämatopoetische Stammzellen zu *glomerulären* mesangialen Zellen ausdifferenzieren (Imasawa 2003; Imasawa et al. 2001).

Weiterhin konnten in einem Ratte-Ratte-Modell nach Transplantation hämatopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark transgener eGFP⁺-Ratten (eGFP bedeutet verstärkt grün fluoreszierendes Protein) in normale Empfängertiere bis zu 12% der *glomerulären* Zellen, die Glomeruli besiedeln, durch Nachweis der Grünfluoreszenz als Zellen aus Stammzellen des Spenders identifiziert werden (Imai und Ito 2002; Ito et al. 2001).

In einem Maus-Maus-Modell differenzierten hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark in Nierenepithel-Zellen (Donovan und Gearhart 2001).

In einem weiteren Maus-Maus-Modell wurde demonstriert, dass krankhafte Veränderungen am Tubulus immer auch mit einer Infiltration hämatopoetischer Progenitorzellen in die regenerierten Tubuli assoziiert sind (Gupta et al. 2002).

Ebenfalls konnte in einem Maus-Maus-Modell auf proximalen *Tubuluszellen* der Mäuseniere, die nach Transplantation eines männlichen Spendertieres auf einen weiblichen Empfänger über das männliche Y-Chromosom nachgewiesen wurden, auch ein *tubulärer* Transporter Na/Pi-2 auf 8% der Zellen gezeigt werden (Lin et al. 2003).

In einem Mensch-Mensch-Modell konnten schließlich Y-chromosomale Zellen des männlichen Empfängers in XX-Spendernieren gefunden werden (Donovan und Gearhart 2001).

1.5 Neuer Aspekt: Xenotransplantation Mensch-Maus

Die vorliegende Arbeit nutzt als neuen Gesichtspunkt das Xenotransplantationsmodell Mensch-Maus: Stammzellen der humanen Nabelschnur werden in eine Mäuseniere transplantiert.

Es werden immunsupprimierte Mäuse (SCID (severe combined immunodeficient)-Mäuse, Ursprungstier CB-17 scid/scid, Mäuse aus eigener Haltung der Universitätsmedizin Göttingen; die Mäuse sind mehrere Monate alt) eingesetzt. Diese Mäuse eignen sich deshalb hervorragend, da sie keine T-, B- oder natürlichen Killerzellen für eine gezielte Abwehr des humanen zellulären Materials besitzen. Eine Immunabwehr der Maus gegen die humanen Stammzellen kann somit drastisch reduziert werden (Kuçi et al. 2003). SCID-Mäuse werden aus diesem Grund unter Reinraumbedingungen gehalten.

1.6 Stammzellen

1.6.1 Allgemeines zu Stammzellen

Es wird zwischen den Termini *Stammzelle* und *Progenitorzelle* unterschieden. Während Stammzellen sich durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung auszeichnen, haben Progenitorzellen bereits den Weg zur Differenzierung in bestimmte Zelltypen eingeschlagen und sind zum Teil schon spezialisiert.

Progenitorzellen lassen sich durch Marker auf ihrer Oberfläche charakterisieren. Humane hämatopoetische Progenitorzellen zeichnen sich durch die Oberflächen-Antigene CD133 und CD34 aus (CD = cluster of differentiation). Untersucht wird das Differenzierungsverhalten humaner CD133-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen im Kontext der Regeneration muriner

Nierentubuluszellen. CD133-positive Progenitorzellen sind phylogenetisch und ontogenetisch jünger als CD34-positive Progenitorzellen und damit auch potenter für die Niere (Bussolati et al. 2005).

Viele Begriffe, die Stammzellen charakterisieren, stammen von ihrem Verhalten *in vivo* (im menschlichen Körper, nach Transplantationen) oder *in vitro* (unter bestimmten Laborbedingungen). Stammzellen haben noch keine gewebespezifischen Strukturen. Sie charakterisiert die bemerkenswerte Fähigkeit, sich beliebig oft zu teilen - oft ihr ganzes Leben lang. Unter bestimmten Bedingungen beziehungsweise durch Signale aus ihrer Umgebung findet eine Differenzierung zu den verschiedenen Zelltypen des Organismus (zum Beispiel Muskel-, Nerv- oder Herzzellen) statt. Der menschliche Körper besteht aus mehr als 200 verschiedenen Zellarten.

Man unterscheidet bei der Stammzellteilung zwischen einer symmetrischen und einer asymmetrischen Teilung. Symmetrisch bedeutet, dass nach einer Teilung zwei weitere Stammzellen vorliegen. Die "Mutterstammzelle" hat sich quasi selbst erneuert beziehungsweise reproduziert. Bei einer asymmetrischen Teilung liegen eine Stammzelle und eine sogenannte Vorläuferzelle (Progenitorzelle) vor. Eine Progenitorzelle ist nur zum Teil spezialisiert, in ihrer weiteren Entwicklung differenziert sie sich in eine bestimmte Gewebezelle (zum Beispiel Muskel- oder Nervenzelle) aus. Dies hängt unter anderem von der spezifischen Mikroumgebung, genannt Nische, der Zelle ab (Schlotzer-Schrehardt et al. 2007).

Erstaunlich ist die enorme Plastizität von Stammzellen. So kann ein ganz anderer Zelltyp aus dem ursprünglich vorgegebenen entstehen. Beispielsweise kann sich aus einer hämatopoetischen Stammzelle außer einer Blut- unter anderem auch eine Nervenzelle entwickeln (Mezey et al. 2000). Umgekehrt kann sich eine adulte neuronale Stammzelle zu einer hämatopoetischen Zelle dedifferenzieren (Mezey und Chandross 2000; Bjornson et al. 1999).

Die Differenzierungsfähigkeit lässt sich anhand ihres Ausmaßes in toti- beziehungsweise omnipotent, pluri-, multi, oligo- und unipotent einteilen.

- Totipotente Stammzellen können theoretisch noch einen vollständigen Organismus hervorbringen, was bedeutet, dass noch alle Zelltypen entstehen können. Die befruchtete Eizelle ist bis zum Achtzellstadium totipotent.
- Pluripotente Stammzellen können sich zwar noch zu allen Gewebearten differenzieren, jedoch kann sich aus ihnen kein ganzer Embryo entwickeln, da keine Plazenta beziehungsweise extraembryonales Gewebe mehr entstehen kann. Sie werden aus der Blastozyste gewonnen,

und zwar aus der inneren Zellmasse. Pluripotente Stammzellen, die aus primordialen Keimzellen des Fetus isoliert werden, werden als embryonale Keimzellen bezeichnet.

Pluripotente Stammzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Regeneration geschädigten Gewebes (Slack 2000).

- Multipotente Stammzellen sind mit ihrem Differenzierungspotenzial auf die jeweiligen Gewebe beziehungsweise Organe, aus denen sie stammen, beschränkt. Zum Beispiel können sich aus den hämatopoetischen Stammzellen die verschiedenen Blutzellen (Lymphozyten, Erythrozyten et cetera) entwickeln.

In neueren Studien wird hämatopoetischen Stammzellen durch ihr Vermögen, sich auch in andere Gewebearten zu differenzieren, Pluripotenz eingeräumt (Ratajczak et al. 2007; Serafini and Verfaillie 2006; Snykers et al. 2006; Krause 2002).

- Oligopotente Stammzellen sind in ihrer Differenzierung eingeschränkter als multipotente Stammzellen, beispielsweise können sich aus den lymphoiden Stammzellen lediglich Lymphozyten entwickeln, aber keine Erythrozyten, Thrombozyten oder Granulozyten.
- Unipotente Stammzellen können nur noch einen einzigen Zelltyp bilden, zum Beispiel Erythrozyten.

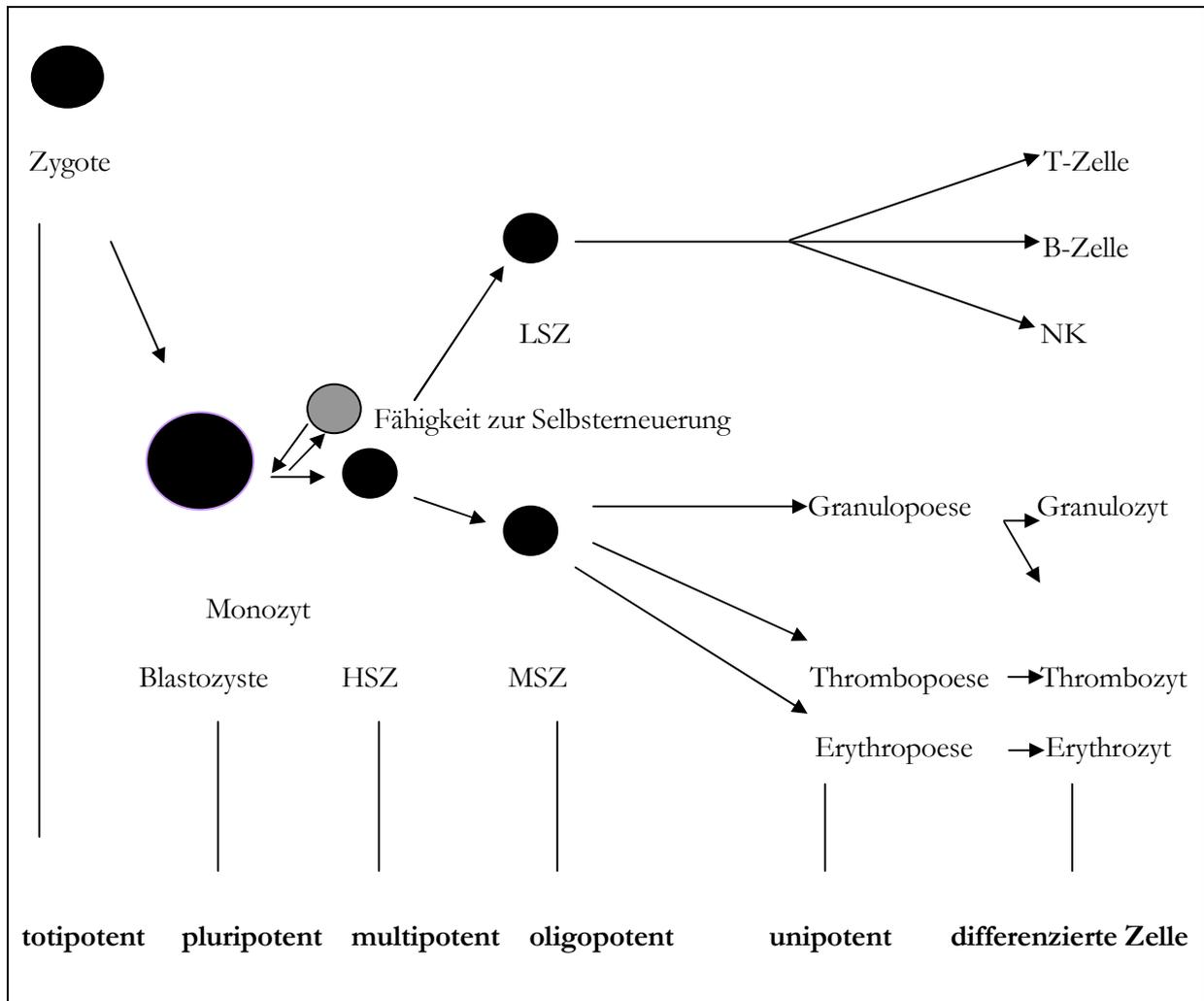


Abbildung 1: Vereinfachtes Differenzierungsschema von Stammzellen am Beispiel der Hämatopoese. HSZ = Hämatopoetische Stammzelle; MSZ = Myeloische Stammzelle; LSZ = Lymphoide Stammzelle; NK = Natürliche Killerzelle

1.6.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen werden aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste im Achtzellstadium am dritten Tag nach der Befruchtung gewonnen (Reubinoff et al. 2000; Thomson et al. 1998; Bongso et al. 1994). Es handelt sich um pluripotente Stammzellen, da sich aus ihnen zwar jede Gewebeform entwickeln kann, jedoch kein vollständiger Organismus (Smith 2001; Amit et al. 2000).

Zum einen werden für die Forschung in Tiermodellen Mäuseembryonen verwendet, zum anderen gibt es drei unterschiedliche Arten, humane embryonale Stammzellen zu gewinnen, und zwar:

1. aus überzähligen Embryonen bei einer in-vitro-Fertilisation.

Bei einer künstlichen Befruchtung werden immer mehr Blastozysten angelegt als für die Transfektion benötigt werden. Die überzähligen Blastozysten werden dann für die Forschung verwendet (Thomson et al. 1995).

2. aus abgetriebenen oder abortierten Feten.

Die primordialen Keimzellen - die Vorläuferzellen von Ei- und Samenzellen - werden aus fünf bis neun Wochen alten Feten isoliert und unter Kulturbedingungen Stammzellen gezüchtet (Shamblott et al. 1998; Resnick et al. 1992).

3. durch Kerntransfer/therapeutisches Klonen.

Es werden eine Eizelle und eine somatische Zelle benötigt. Die Eizelle wird entkernt und erhält das Erbmateriale der somatischen Zelle. Durch elektrische Stimulation wird diese "neue Zelle" angeregt, sich zu teilen. Es entsteht eine Blastozyste, aus der die Stammzellen gewonnen werden können (Yang et al. 2007).

Die Nutzung embryonaler Stammzellen ist ethisch sehr umstritten. In Deutschland ist die Verwendung von Embryonen durch das Embryonenschutzgesetz (EschG vom 13.12.1990) verboten. Allerdings darf mit aus dem Ausland stammenden menschlichen embryonalen Stammzelllinien geforscht werden. Der Stichtag der Gewinnung embryonaler Stammzellen in ausländischen Labors wurde im Jahr 2008 vom ursprünglichen Datum 01.01.2002 auf den 01.05.2007 verschoben. Somit stehen deutschen Forschern jüngere Stammzelllinien zur Verfügung.

1.6.3 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen weisen im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen eine verminderte Proliferations- und Differenzierungskapazität auf. Ihre Telomeraseaktivität ist geringer. Die Gewinnung ist ethisch gesehen unbedenklich. Adulte Stammzellen können relativ einfach beim Menschen jeden Alters aus einer peripheren Blutentnahme isoliert werden. Die Anzahl sowie die Telomerlänge adulter humaner Stammzellen verringern sich jedoch mit zunehmendem Alter. Es handelt sich um undifferenzierte Zellen in einem aber ansonsten völlig ausdifferenzierten Gewebe. Für viele Gewebearten sind jeweils spezifische Vorläuferzellen bekannt, die in ihrer jeweiligen Nische solange "ausharren", bis sie von ihrer Mikroumgebung ein Signal zur Teilung erhalten. Damit ersetzen sie

abgestorbene beziehungsweise geschädigte Zellen und sorgen somit für eine Homöostase der Zellzahl. Zu den adulten Stammzellen zählt man Stammzellen aus dem Knochenmark, aus der Nabelschnur und mesenchymale Stammzellen.

Unter den adulten Stammzellen sind bisher die hämatopoetischen Stammzellen am Besten typisiert. Sie sind seit etwa 40 Jahren bekannt (Becker et al. 1963; Till und McCulloch 1961). Da sie sich in ihrer Morphe nur schwer von Lymphozyten unterscheiden lassen und diesen unter dem Mikroskop ähnlich sehen, erfolgt ihre Charakterisierung anhand bestimmter Oberflächenmarker, die von Stammzellen in ihrem jeweiligen Entwicklungsstadium exprimiert werden. Für hämatopoetische Progenitorzellen charakteristisch sind die Antigene CD34 (Skotnicki et al. 1999; Krause et al. 1996, Krause et al. 1994) und CD133 (Miraglia et al. 1997; Yin et al. 1997). CD133 wird auf CD34-negativen sowie unreifen CD34-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen exprimiert und scheint dadurch eine höhere Spezifität als Stammzellmarker zu besitzen (Gallacher et al. 2000).

Der Anteil CD34-positiver Progenitorzellen an der Gesamtlmphozytenpopulation im peripheren Blut liegt bei <0,5%, im Knochenmark beträgt der Anteil 1,5% (Loges 2004). Unter dem Einfluss von G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) erhöht sich die Prozentzahl auf 1,75% (de Wynter et al. 1998; Civin et al. 1987).

Der Anteil CD133-positiver Progenitorzellen beträgt im mobilisierten peripheren Blut 1,4% und im Knochenmark 0,5% (Loges 2004).

Im Knochenmark machen die CD133-positiven Progenitorzellen 36% der Population der CD34-positiven Zellen aus (de Wynter et al. 1998).

Das Nabelschnurblut eines Säuglings enthält in der vierzigsten Schwangerschaftswoche bezogen auf die Gesamtpopulation der Lymphozyten durchschnittlich circa 1% CD34-positiv Zellen (Thilaganathan et al. 1994) sowie circa 0,3-0,6% CD133-positiv Zellen (Merz 2005).

CD133-/CD34-doppelt-positiv Progenitorzellen sind an der Gesamtlmphozytenpopulation des Nabelschnurblutes durchschnittlich mit einem Anteil von ungefähr 0,3-0,6% vertreten (Merz 2005).

1.6.4 Nabelschnurblut als jüngste Quelle adulter hämatopoetischer Stammzellen

Die jüngsten adulten Stammzellen sind die hämatopoetischen Stammzellen des Nabelschnurvollblutes. Sie lassen sich recht einfach post partum durch eine Punktion der Nabelschnurvene gewinnen. In der Regel sind sie durch den immunologischen Schutz im Mutterleib frei von Viren oder Tumorzellen.

Bei Nichtübereinstimmung der HLA-Merkmale von Spender und Empfänger sind hämatopoetische Stammzellen der Nabelschnur für den Patienten nach einer Transplantation verträglicher als Stammzellen aus dem Knochenmark (Laughlin 2001). Nabelschnurblut-Stammzellen verfügen über ein hohes Vermehrungs- und Differenzierungspotenzial. Durch ihre hohe Plastizität eignen sie sich nicht nur für die Therapie von Krebserkrankungen, sondern finden in verstärktem Maße ihren Einsatz in der regenerativen Medizin (van de Ven et al. 2007; Stocum 2001). Aus ethischer Sichtweise betrachtet ist die Verwendung von Stammzellen aus Nabelschnurblut unbedenklicher als beispielsweise die Nutzung von embryonalen Stammzellen.

Der Gebrauch von Nabelschnurblut als Quelle hämatologischer Stammzellen bietet eine Alternative zur Transplantation allogener Knochenmark- oder Blutstammzellen. Bisher sind weltweit bereits über 1500 Patienten mit aus Nabelschnurvollblut gewonnenen Stammzellen behandelt worden. Schon im Jahr 1988 transplantierte *Eliane Gluckman* diese Zellen erfolgreich einem Kind mit Fanconi-Anämie (Gluckman et al. 1989).

1.6.5 Spermatogoniale Stammzellen

Außer embryonalen und adulten Stammzellen steht eine dritte Gruppe seit kurzer Zeit im Blickfeld der Forschung, die spermatogoniale Stammzellen. Sie verhalten sich in vielen Versuchen ähnlich wie embryonale Stammzellen, stoßen jedoch im Gegensatz zu diesen bei ihrem Einsatz kaum auf ethische oder immunologische Einwände.

Der Grundstein für den Einsatz muriner spermatogoniale Stammzellen ist in den vergangenen Jahren gelegt worden, in denen Prof. Dr. Wolfgang Engel in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Gerd Hasenfuß, Direktor der Abteilung Kardiologie und Pneumologie der Universitätsmedizin Göttingen, bereits das Differenzierungspotenzial spermatogoniale Stammzellen, gewonnen aus dem Hodengewebe adulter Mäuse, erforschte.

Dabei stellte dieses Team fest, dass sich spermatogoniale Stammzellen ähnlich wie embryonale Stammzellen verhalten und das Merkmal einer Pluripotenz aufweisen, indem sich diese Zellen in verschiedene Zelltypen aller drei Keimblätter - unter anderem in Herzmuskelzellen - ausdifferenzieren (Guan K et al. 2007; Nayernia 2007; Guan K et al. 2006). Spermatogoniale Stammzellen könnten demnach durchaus eine Alternative in der Stammzelltherapie darstellen; sie sind ethisch betrachtet unbedenklicher zu gewinnen als embryonale Stammzellen, da keine Embryonen beziehungsweise ein

ganzer lebensfähiger Organismus für Forschungszwecke "geopfert" werden muss.

Jüngst ist es sogar einer Forschungsgruppe in Tübingen gelungen, spermatogoniale Stammzellen aus menschlichem Hodengewebe zu gewinnen (Conrad et al. 2008).

1.7 Das Prinzip der epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung

Abgesehen von den aktuellen Forschungsstandpunkten bezüglich der Verwendung von externen Stammzellen als Regenerationsquelle geschädigten Nierengewebes, ist ebenso zu bedenken, welche physiologischen Reparaturmechanismen der Niere selbst zur Verfügung stehen.

Viele Arbeiten gehen davon aus, dass die Niere ein eigenes Stammzellreservoir besitzt und dieses bei Schädigung aktiviert wird. Überlebende Zellen werden durch Zytokine zur Regeneration angeregt (durch Dedifferenzierung und anschließende Redifferenzierung) (Bussolati et al. 2005; Lin 2006).

Was passiert aber genau, wenn eine Nierenerkrankung, sei sie ausgelöst durch glomeruläre, tubulointerstitielle oder vaskuläre Faktoren, einen chronisch-progressiven Verlauf annimmt?

Michael Zeisberg und andere Forscher haben das Phänomen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) mit seiner Auswirkung auf die Niere näher untersucht und herausgefunden, dass dieser Prozess eine wichtige Rolle für das Fortschreiten einer Nierenfibrose spielt. EMT ist notwendig für die Embryonalentwicklung, für Tumorprogression und Organfibrose (Zeisberg und Kalluri 2004; Zeisberg et al. 2001). Sie beschreiben den Vorgang der EMT wie folgt:

Epithelzellen verlieren ihre charakteristischen Eigenschaften und nehmen einen mesenchymalen Phänotyp an. Für die Niere bedeutet dies, dass sich Tubuluszellen von der Basalmembran lösen und in mesenchymale Zellen/Fibroblasten differenzieren, die dann in das interstitielle Bindegewebe wandern und dadurch einer Apoptose entgehen können, was jedoch eine tubuläre Atrophie zur Folge hat. EMT ist ein reversibler Prozess, möglicherweise ausgelöst durch überlebende Zellen, welche redifferenzieren und verletztes Tubulusgewebe funktionserhaltend ersetzen.

Verschiedene Mediatoren spielen eine entscheidende Rolle bei der EMT. Der wichtigste unter ihnen ist der transformierende Wachstumsfaktor- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1), daneben der epitheliale Wachstumsfaktor (epithelial growth factor, EGF), der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor, bFGF) und Interleukin-1 (IL-1). TGF- β 1 führt zu einer Zerstörung der Basalmembran: Die Tubuluszellen lösen sich von ihrer Unterlage, verlieren ihre

epithelialen Marker wie Zytokeratin oder E-Cadherin und exprimieren mesenchymale Marker wie das Fibroblasten-spezifische Protein-1 (fibroblast-specific protein-1, FSP-1) und Vimentin. Sie werden somit zu Bindegewebszellen. Es kann zum anderen jedoch auch ein direkter Zelltod via Apoptose erfolgen.

Studien zeigen, dass es zu TGF- β 1 einen physiologischen Gegenspieler in der Niere gibt, nämlich das Knochen-Morphogenese-Protein-7 (bone morphogenetic protein-7, BMP-7) (Zeisberg et al. 2003). BMP-7 spielt eine wichtige Rolle während der Nierenentwicklung, indem es eine mesenchymal-epitheliale Transdifferenzierung (MET) generiert (Zeisberg et al. 2005). In adulten Nieren ist das Protein für die Aufrechterhaltung der Homöostase verantwortlich (Zeisberg and Kalluri 2004). Bei Nierenerkrankung wird es vermindert exprimiert, während TGF- β 1 überexprimiert wird (Zeisberg und Kalluri 2004).

Inwiefern dieses Wissen nun in der Praxis der Therapie von Nierenerkrankungen weiterhelfen kann, bleibt weiterhin Forschungsthema.

1.8 Schädigung durch das Ischämie/Reperfusionen-Modell

Bei den in dieser Arbeit eingesetzten SCID-Mäusen wird ein *künstlicher* Nierenschaden erzeugt, und zwar orientierend an dem sogenannten Ischämie/Reperfusionen-Modell: Vor der Transplantation der humanen Stammzellen unter die rechte Nierenkapsel wird die gleichseitige Arteria renalis über mehrere Minuten abgeklemmt und somit die Blut- beziehungsweise Sauerstoffversorgung der Niere für diese Zeit unterbrochen.

Hypoxie, zum Beispiel im Rahmen eines Schocks auftretend, ausgelöst durch eine Minderperfusion der Niere, stellt die häufigste Ursache eines akuten Nierenversagens dar. Die Niere gehört zu den sogenannten Schockorganen und reagiert sehr sensibel auf Sauerstoffmangel.

Akutes Nierenversagen geht häufig mit Multiorganversagen und Sepsis einher und ist verbunden mit einer erhöhten Mortalitätsrate (Chertow et al. 1998).

In Studien kann kein Zusammenhang zwischen Umfang der Schädigung und Krankheitsverlauf beobachtet werden, wohl aber einer zwischen Dauer der Erkrankung und Letalität des Patienten (Edelstein et al. 1997).

Bei der Hypoxie der Nieren ist die glomeruläre Filtration aufgrund einer persistierenden Vasokonstriktion vermindert, unterstützt durch Aktivierung des tubulo-glomerulären Feedback-

Systems (Oken 1984). Zu verzeichnen ist ein erhöhter basaler Gefäßtonus sowie ein Ungleichgewicht vasokonstriktiver und vasodilatatorischer Faktoren zu Gunsten der erst genannten (Conger und Weil 1995). Die Expression proinflammatorischer Zytokine und Adhäsionsmoleküle bewirkt eine Rekrutierung von Leukozyten und führt zu einer Leukozyten-Endothel-Interaktion, wodurch die Durchblutung zusätzlich gedrosselt wird (Bonventre und Weinberg 2003).

Es kommt zu einem Verlust der renalen Autoregulation durch NO-vermittelte endotheliale Dysfunktion (Guan Z et al. 2006).

Für die Sauerstoffunterversorgung der Tubuluszellen scheint dabei jedoch nicht die Reduktion des totalen Blutflusses, sondern vielmehr eine regional verminderte Durchblutung des äußeren Markbereiches entscheidend zu sein (Vetterlein et al. 1968).

Primär und am schwersten sind die proximalen Tubuluszellen von einer Schädigung betroffen (Bellini et al. 2007, Bonventre und Weinberg 2003, Chien et al. 2001). Diese Zellen sind metabolisch sehr aktiv, können aber im Gegensatz zu den übrigen Zellen des Tubulussystems ATP größtenteils lediglich durch oxidative Phosphorylierung generieren (Bonventre und Weinberg 2003; Bagnasco et al. 1985; Guder und Ross 1984).

Während der Ischämiephase kommt es zu einem massiven Abfall des intrazellulären ATP-Gehaltes. Durch anaerobe Glykolyse kann die Energieversorgung der Zellen nur kurzzeitig überbrückt werden. Lactat häuft sich als Abfallprodukt in den Tubuluszellen an, daraus resultiert ein Abfall des pH-Wertes (renale Azidose). Die Na-K-ATPase erliegt dem Energiemangel, es kommt zum Einstrom von Natrium-, Calcium- und Chlorid-Ionen sowie osmotisch bedingt von Wasser in die Zellen mit konsekutiver Zellschwellung und Zerstörung des Zytoskeletts. Die Zellpolarität und die Integrität der Basalmembran werden aufgehoben. Die Zellen sterben ab, lösen sich von ihrer Unterlage sowie durch Schwächung der Zell-Zell-Verbindungen (tight junctions) von ihren Nachbarzellen und gelangen in das Tubuluslumen, welches sie verstopfen (Kwon O et al. 1998; Sutton und Molitoris 1998). Durch die Einengung des Lumens steigt dort der Druck an und die glomeruläre Filtrationsrate nimmt weiter ab. Dadurch, dass Natrium weniger rückresorbiert wird, kommt es zu einer Stimulation des juxtaglomerulären Apparates und damit zu einer Freisetzung von Renin. Dieses Enzym ist für die Spaltung von Angiotensinogen in Angiotensin I verantwortlich, es führt zu einer Vasokonstriktion und somit weiteren Minimierung der Nierendurchblutung.

Auch die peritubulären Gefäße verändern sich und inflammatorische Gene werden aktiviert. Es kommt zu einer Zellschwellung und dem Lösen der Zellen von der Basalmembran (Sheridan und Bonventre

2000; Thadhani et al. 1996). Durch permanente Vasokonstriktion wird der peritubuläre Blutfluss reduziert, wodurch die initiale Ischämie exazerbiert (Conger und Weil 1995).

Die Tubuluszellen verstärken ihrerseits noch die Schädigung der Niere, indem sie sich am Entzündungsprozess durch Ausschüttung von Zytokinen, wie beispielsweise von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8) und/oder dem auf Monozyten chemotaktisch wirkenden Protein-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) - ein *circulus vitiosus*.

Setzt der Blutfluss durch die Arteria renalis wieder ein, kann sich die Niere von dem Schaden erholen und die Zellfunktion meist völlig wiederhergestellt werden.

Andererseits ist es jedoch auch möglich, dass das Nierengewebe durch die Reperfusion eine weitere Schädigung erleidet, hauptsächlich erklärbar durch die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen (McCord 1985). Diese Sauerstoffradikale entstehen in allen aerob lebenden Lebewesen aufgrund der Fähigkeit zur sauerstoffabhängigen Oxidation wasserstoffübertragender Coenzyme im Energiestoffwechsel. Hauptbildungsstätte sind Mitochondrien aufgrund der dort ablaufenden Atmungskette. Unter physiologischen Bedingungen werden die Radikale durch eine Reihe von Mechanismen (zum Beispiel enzymkatalysiert) abgebaut (Bonventre 1993). Kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Bildung und Abbau zu Gunsten der Bildung, kann daraus eine Schädigung des Gewebes resultieren, was als oxidativer Stress bezeichnet wird. Eine Reihe von Biomolekülen (DNA, Proteine, Lipide) werden durch reaktive Sauerstoffspezies modifiziert und in ihrer Funktion blockiert.

Forscher haben herausgefunden, dass während der Reperfusionsphase proximale Tubuluszellen im Gegensatz zu distalen Tubuluszellen vermehrt Sauerstoffradikale bilden, was die proximal in verstärktem Maße ablaufenden apoptotischen Vorgänge erklären könnte (Chien et al. 2001).

Entscheidende Bedeutung für die Wiederherstellung der Nierenfunktion beim akuten Nierenversagen liegt demnach in der Regenerationskapazität der proximalen Tubuluszellen (Bush et al. 1999). Die Prognose ist dabei umso günstiger, je schneller und umfangreicher die Regeneration überlebender Zellen stattfindet (Kwon O et al. 1998).

1.9 Medikamentös-toxische Variante der Nierenschädigung am Beispiel des Antimykotikums Amphotericin B

Eine weitere Möglichkeit, eine Nierenschädigung hervorzurufen, ist die medikamentös-toxische Variante, wie beispielsweise durch das Antimykotikum Amphotericin B. Anders als bei dem Ischämie/Reperfusionen-Modell schädigt es *selektiv* murine Tubuli und führt eher zu einer chronischen Schädigung. Amphotericin B beeinflusst die glomeruläre Filtrationsrate basierend auf einer renalen Vasokonstriktion mit konsekutiver Reduktion des renalen Blutflusses und hierdurch bedingter Minderung der glomerulären Filtrationsrate (Goldman und Koren 2004; Mayer und Doubek 1998). Es resultieren eine renale Azidose sowie verstärkte Kalium- und Magnesiumverluste (Herzog et al. 2003; Branch 1988).

Es wird beobachtet, dass die Schwere der Nierenschädigung mit der eingesetzten Dosis und Behandlungsdauer von Amphotericin B korreliert (Oto et al. 2007; Rieger et al. 2007) - je höher die Konzentration, desto stärker und umfangreicher die Schädigung.

1.10 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, im Rahmen eines Xenotransplantationsmodelles Mensch-Maus zu zeigen, inwieweit CD133-positive hämatopoetische Progenitorzellen, gewonnen aus humanem Nabelschnurvenenblut, nach der Transplantation in eine hypoxisch geschädigte Mäuseniere das Tubulusepithel zu regenerieren vermögen. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden (Fluoreszenzmikroskopie, Laser-Scanning-Zytometrie, PCR und FISH) soll dabei der Nachweis der Integration von CD133-positiven Progenitorzellen in das murine Nierengewebe erfolgen.

Viele Nierenerkrankungen lassen sich bisher nur durch eine Dialyse oder sogar Nierentransplantation behandeln. Eine möglicherweise zukünftig neue Therapieoption renaler Defekte durch Stammzellen könnte dabei eine vielversprechende Alternative darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In diesem Teil der Dissertation sind die Materialien tabellarisch aufgeführt, die im Rahmen der Arbeit eingesetzt werden.

2.1.1 Plastikwaren

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
S-Monovette®-EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	6343301	01.1605.003
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	7191 E	86.1253.001
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	6363 E	86.1254.001
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	7009 K	86.1685.001
Pipettenspitzen mit Filter 2,5 µl, farblos	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	5053101	70.1130.212
Pipettenspitzen mit Filter 10 µl, farblos	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	6054601	70.1115.210
Pipettenspitzen mit Filter 100 µl, gelb	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	5050501	70.760.212
Pipettenspitzen mit Filter 1000 µl, blau	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	6053101	70.762.211
Zentrifugenröhrchen 15 ml, konisch	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	5041001	62.554.502
Kulturflaschen 25 cm ² , blaue Verschlusskappe	Becton Dickinson Biosciences Falcon, Bedford, USA	137202	353108
Reagiergefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland	0000/7214001	72.690
MACS-Säule	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	550701044	130-042-201

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
MACS - Rundbodenröhrchen 5 ml, 12 x 75 mm	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	5070206178	130-042-201
PCR-Gefäß 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland	05021	711088

2.1.2 Glaswaren

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
Objektträger SuperFrost® Plus 25 x 75 x 1.0 mm	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland	28696	J1800AMNZ
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland	0083184	BB024060A1

2.1.3 Gerätschaften

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
Biofuge 15 R	Heraeus Sepatech, Stuttgart, Deutschland
CO ₂ -Inkubator 1500	Flow Laboratories, Irvine, Schottland
Digitale Kamera	Olympus Optical Co. GmbH, F-View I, Hamburg, Deutschland
Drucker, Zubehör UV-Transilluminator	Mitsubishi Electric Corporation, Tokyo, Japan
Eismaschine	Scotsman® Ice Systems, Illinois, USA
Eppendorf-Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACSCalibur™ Durchflusszytometer	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland
Flüssigstickstofftank	Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland
Fluoreszenzfilter	AHF-Filtertechnik, Tübingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop IX71, invers	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
Gefriermikrotom Jung CM 3000	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
Gelelektrophorese-Gerät	Life Technologies, Gaithersburg, USA
Heizblock (DRI-Block® DB·2D)	Techne, Cambridge, Großbritannien

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>
iCys® Laser-Scanning-Zytometer	Compucyte Corporation, Cambridge, USA
Invertmikroskop Zeiss ID03	Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Operationsbesteck	Bestände der Chirurgischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen
PALM® Microbeam	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Bernried, Deutschland
PCR Mastercycler®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet pro	Brand, Milian, USA
Schüttler M3D	Grant-bio, Cambridge, Großbritannien
Sterilbank	NuAire Inc. Biological Safety Cabinets, Plymouth, USA
Quecksilber-Dampflampe	Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
UV-Transilluminator	Vilber Lourmat, Marne, Frankreich
VarioMACS™ Zellseparator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
Vortexer G-560 E	Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland
Wärmebad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH & Co. (GFL), Hannover, Deutschland
Wärmeplatte	Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge 3-18 K	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode, Deutschland
Zytozentrifuge	Shandon, Cheshire, England

2.1.4 Lösungen, Puffer, Chemikalien

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
Biocoll-Trennlösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland	1043 K	L 6115
PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung) pH 7,4	GIBCO® Invitrogen, Paisley, Großbritannien	8277	7011-036

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
RPMI 1640-Kulturmedium 500 ml ohne L-Glutamin: <u>Komplettes Medium:</u>	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	E03906-1790	E15-039
RPMI 1640-Kulturmedium 450 ml	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	E03906-1790	E15-039
ad 50 ml FCS (Fötale Kälberserum)	GIBCO® Invitrogen, Paisley, Großbritannien	41Q5460K	10270-106
ad 5 ml L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	M00405-0045	M11-004
ad 5 ml Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	P01007-0596	P11-010
ad 5 ml Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	P01007-0596	P11-010
ad 12,5 ml 1M Hepes-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	S00104-0296	S11-001

Folgende Puffer und Lösungen werden im Rahmen dieser Arbeit angesetzt:

<i>Puffer/Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer, steril Stocklösung 50x	242,28 g Tris (2 mol/l) 18,61 g EDTA-Na (0,05 mol/l) 60,05 g Eisessig 100% (1 mol/l) ad Aqua bidestillatus, Gesamtvolumen 1 Liter. (Gebrauchslösung 1x) pH 8,3
Probenbeladungs-Puffer	Glycerol 30% (1,5 g) Bromphenolblau 0,25% (0,0125 g) Xylen-Cyanol FF 0,25% (0,0125 g) ad Aqua bidestillatus, Gesamtvolumen 5 ml. pH 7,2-7,4

<i>Puffer/Lösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Erythrozyten-Lyse-Puffer, steril	8,29 g NH ₄ Cl 1,0 g KHCO ₃ 0,037 g EDTA ad Aqua bidestillatus, Gesamtvolumen 1 Liter. pH 7,2-7,4
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)/MACS-Puffer, steril	0,744 EDTA (2 mM) 5 g BSA (Rinder-Serumalbumin) (0,5%) ad 1x PBS, Gesamtvolumen 1 Liter. pH 7,2-7,4
PBS-Puffer, Stammlösung 20x, steril	29,25 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 4,9 g KH ₂ PO ₄ 160 g NaCl ad Aqua bidestillatus, Gesamtvolumen 1 Liter. pH 7,2-7,4
SSC (Standard-Salz-Citrat)-Puffer, steril	87,65 g NaCl (3 M), 44,1 g NaCitrat (300 mM), in 400 ml DEPC-Wasser lösen, pH (7,0) mit 2-molarer Zitronensäure einstellen, ad 500 ml mit DEPC-Wasser auffüllen.
Pepsinlösung	0,5 g Pepsin 0,9% NaCl-Lösung pH 1,6 (Einstellen mit 2-molarer Salzsäure)
Sondenlösung	1 µl Sonde 7 µl CEP (Citrat-EDTA)-Puffer 2 µl H ₂ O Bei 75°C 5 Minuten denaturieren.
Proteinase-K-Lösung	Arbeitskonzentration 2 µl/ml, 150 µl Proteinase K ad 75 ml 1x PBS
TAE-Agarose-Gel 2%	2 g Agarose ad TAE-Puffer, Gesamtvolumen 100 ml.
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser, steril	97%-Diethylpyrocarbonat ad Aqua bidestillatus, Gesamtvolumen 1 Liter. Inkubation über Nacht bei 37°C.
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid 0,02% in TAE 0,5x Konzentration.

Weitere Chemikalien:

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	08570183	5052.2
Mowiol®	Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla/ Kalifornien, USA	B23468	475904
Eukitt® Einschlussmedium	O. Kindler GmbH & Co., Freiburg, Deutschland	C83	03989
Jung Einbettmedium	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland	646251	0201 08926
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	L00406-0687	L11-004
Hämatoxylin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	K32338402340	1.04302.0025
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	ZC223635	1.15935.0100
Mineralöl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	096K01671	M 5904
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	K359788363616	1.00063.2500
Pepsin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	074K77164	E6887
Natriumthiocyanat (NaSCN)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	K28595527327	1.06627.2500
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	K36047174626	1.00974.2511
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	51684090	8388.6
Proteinase K	Stratagene, La Jolla/ Kalifornien, USA	R788342	300140

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
Formamide	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	128H0163	F-7508
Chloro-Methyl-Phenol-(CEP)-Hybridisierungs-Puffer	Vysis Inc., Downers Grove/Illinois, USA	63275	30-804828
Roti-Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	38466842	6640.1
ProLong® Antifade-Kit (mounting medium, antifade reagent)	Molecular Probes Invitrogen detection technologies, Eugene/Oregon, USA	02E5-1	P7481
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	K35163700539	1.06400.5000
Invisorb® RNA-Kit I (100), bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> - Lysis-Puffer R - Waschpuffer - Carrier-Suspension 	Invitek, Berlin, Deutschland	MA060005	10601004
Diethyl-Pyrocyanat (DEPC)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	31K3694	216-542-8
Qiagen® OneStep-RT-PCR-Kit (100), bestehend aus: <ul style="list-style-type: none"> - RT-Puffer 5x - Q-Solution - DNTP-Mix - Enzym-Mix - Rnase-Inhibitor - Rnase-freies Wasser 	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	12195085	210212
Agarose	Invitrogen™ life technologies, Paisley, Schottland	11714	15510-027
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	OC134600	1116080030
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	44361942	3783.1

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
Trishydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	0073269	8382
Xylen-Cyanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland	43420788	A513.1
Bromphenolblau	SIGMA Chemical Co., Sankt Louis, USA	34H3518	62625-28-9

2.1.5 Primer (Hersteller MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Basenpaare</i>
h-GAPDH	vorwärts: 5'-CCC TTC ATT GAC CTC AAC TAC-3' rückwärts: 5'-TGA GTC CTT CCA CGA TAC C-3'	418 418
m-GAPDH	vorwärts: 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3' rückwärts: 5'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC-3'	222 222
h-CD133	vorwärts: 5'-TGA ACA CAC ACC AGT TTA CAG G-3' rückwärts: 5'-ACG CAG GTT TCT CTA TGA TGG C-3'	253 253
h-CD34	vorwärts: 5'-GTC TTG ACA ACA ACG GTA CTG A-3' rückwärts: 5'-CAA GAC CAG CAG TAG ACA CTG A-3'	605 605
h-TH-Protein	vorwärts: 5'-TGA ACT GGG CCT TAT TGG AG-3' rückwärts: 5'-TCT ACT GCG CCT TCC AGA AT-3'	360 360
h-CD13	vorwärts: 5'-CAG GGG CCT GTA CGT TTT TA-3' rückwärts: 5'-GCC ACC ACC TTT CTG ACA TT-3'	333 333
m-96	vorwärts: 5'-ACT CAT AGT CAG AAT CAG CC-3' rückwärts: 5'-CTC CAT CAT CAA ATA ACC AC-3'	322 322

2.1.6 Antikörper, Färbungen

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
CD133-MicroBead-Kit human (CD133/1- Microbeads & FcR-blocking reagent)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	5061004138	130-050-801
FITC-anti-human- CD34, Klon 581	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	0000049955	555821

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Chargennummer</i>	<i>Artikelnummer</i>
PE-anti-human-CD133/2, Klon AC141	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland	5021231008	120-000-426
Vectashield® Einbettmedium mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA	R0512	H-1200
Dolichos-Biflorus-Agglutinin-Lectin-Rhodamin (DBA)	Vector Laboratories Inc., Burlingame/Kalifornien, USA	D0512	RL-1032
Anti-HLA-Klasse-I-Antigen-FITC, monoklonal, Klon W6732	SIGMA-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	115K4843	F5662-100TST
Y-Chromosom-Sonde CEP-Y Spektrum grün	Vysis Inc., Downers Grove/Illinois, USA	64720	32-112024

2.1.7 Medikamente

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Zulassungsnummer</i>	<i>Chargennummer</i>
Ketamin 10%	Pharmanovo GmbH, Hannover, Deutschland	400199.00.00	04H132
Xylazin 2%	CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland	400177.00.00	404170
Isotonische Natriumchlorid-Lösung	Delta Select GmbH, Pfullingen, Deutschland	1299.99.99	24508 H

2.1.8 Tiere

<i>Tier</i>	<i>Herkunft</i>
Immunsupprimierte Mäuse (Severe combined immunodeficient (SCID)-Mäuse)	Ursprungstier CB-17/scid/scid, Medizinische Hochschule Hannover, Prof. Dr. H.D. Hedrich, Abteilung für Versuchstierkunde. Jetzt aus eigener Tierhaltung der Universitätsmedizin Göttingen, Reinraumhaltung.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation humaner Lymphozyten aus Nabelschnurvollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation

CD133-positive hämatopoetische Progenitorzellen gehören zu der Lymphozytenpopulation des peripheren Blutes. Diese Zellen werden in einem ersten Schritt aus Nabelschnurvollblut mittels Dichtegradientenzentrifugation zusammen mit den Lymphozyten von den übrigen Blutbestandteilen isoliert. Das Nabelschnurblut ist dabei nicht älter als 12 Stunden. Das Blut wird in EDTA-Röhrchen direkt postpartal aufgefangen und bei Raumtemperatur gelagert.

Zum Einsatz kommt Biocoll-Trennlösung (Ficoll) der Biochrom KG Berlin - ein hydrophiles Saccharose-Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400.000 Dalton. Es zeichnet sich durch eine größere Dichte (1,07 g/l) als Lymphozyten und Monozyten sowie im Gegenzug durch eine geringere Dichte als Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen aus.

7 ml der Biocoll-Trennlösung werden in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen vorgelegt und 4 ml Blut vorsichtig auf die Trennlösung pipettiert, damit es zu keiner Vermischung kommt, mit anschließender 35-minütiger Zentrifugation bei 1800 Umdrehungen pro Minute (UPM) und 4°C.

Nach der Zentrifugation wird die Interphase, in der sich die Lymphozyten befinden, abpipettiert und in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt sowie ein Waschschrift mit komplettem RPMI (cRPMI)1640-Medium bei 1200 UPM und 4°C über 15 Minuten durchgeführt.

Nachfolgende Abbildung verdeutlicht die Anordnung der unterschiedlichen Phasen in dem Gefäß.

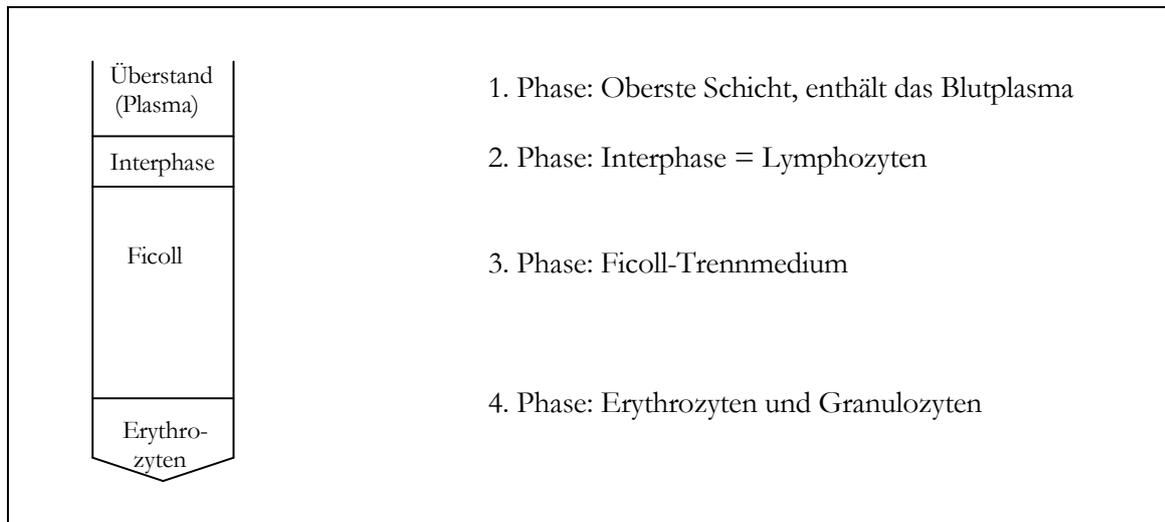


Abbildung 2: Grafische Darstellung der unterschiedlichen Schichten nach Ficoll-Aufreinigung.

Nun wird das Pellet mit den Lymphozyten von den noch übrig gebliebenen Erythrozyten mittels Erythrozyten-Lyse-Puffer "gereinigt" (Einwirkzeit: 8 Minuten). Es erfolgen drei weitere Waschvorgänge, zweimal mit cRPMI 1640-Medium und einmal mit MACS-Puffer (jeweils 15 Minuten bei 1200 UPM, 4°C).

2.2.2 Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)

An die Reinigung der Lymphozyten aus Vollblut schließt der eigentliche Teil der Zellsortierung an, die Magnet-aktivierte Zellsortierung (magnetic activated cell sorting, MACS) (mittels VarioMACS™, Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland).

Mit dieser Methode lassen sich unterschiedlichste Zellpopulationen - in diesem Fall humane CD133-positive hämatopoetische Progenitorzellen - mit hoher Reinheit selektieren.

Das nach Ficoll gewonnene Pellet mit den Lymphozyten wird in 500 µl des MACS-Puffers resuspendiert. Anschließend werden 100 µl eines FcR-blockierenden Reagenzes (humanes IgG) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugegeben, um unspezifische Bindungen zu vermeiden (Einwirkzeit: 2 Minuten). 100 µl der CD133-Microbeads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) werden zugefügt. Es handelt sich hierbei um paramagnetische Mikromoleküle verbunden mit monoklonalen Maus-anti-human-CD133-1-Antikörpern. Mit Hilfe

dieser Microbeads findet eine selektive Bindung der CD133-positiven Progenitorzellen in einem Magnetfeld statt. Es folgt eine Inkubationszeit von 45 Minuten im Dunkeln bei 4°C.

Eine vorgekühlte Säule (4°C) wird mit 1 ml entgastem MACS-Puffer (ebenfalls 4°C) benetzt und in direktem Anschluss die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Nach dem Durchlauf wird noch einmal mit 1-2 ml MACS-Puffer nachgespült.

Danach wird die Säule aus dem Magnetfeld entfernt sowie ihr Inhalt mit 2 ml MACS-Puffer möglichst ohne Zeitverlust in ein neues 15-ml-Falcon-Röhrchen ausgepresst. Erneut wird mit Medium aufgefüllt und über 15 Minuten bei 1200 UPM und 20°C zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen.

Das Zellpellet mit den CD133-positiven Progenitorzellen wird abschließend in Medium aufgenommen und in einer Kulturflasche bis zur Transplantation für 12-24 Stunden im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt.

2.2.3 Trypsinierung der Zellen

Um die Zellen aus der Kulturflasche für die Injektion im Rahmen einer Transplantation zugänglich zu machen, müssen sie zuerst von dem Boden der Kulturflasche, auf dem sie zwischenzeitlich durch Wechselwirkungen mit der Plastikoberfläche adhärent geworden sind, abgelöst werden. Dies geschieht durch den Vorgang der Trypsinierung:

1. Das Medium wird über die unbewachsene Seite abgesaugt.
2. Zuvor steril titrierter PBS-Puffer (37°C) wird zugegeben und die Kulturflasche geschwenkt. Ziel ist es, die Zellen von Proteinen zu waschen, da diese die Wirkung des Trypsins verringern.
3. Der PBS-Puffer wird abgesaugt.
4. Es erfolgt die Zugabe des Trypsins (37°C) auf den Zellrasen.
Adhärenente Zellen lösen sich von ihrer Unterlage.
Trypsin darf nicht zu lange wirken, sonst werden die Zellen geschädigt (maximal 5-10 Minuten).
Die Zellablösung wird zwischenzeitlich unter dem Mikroskop beobachtet.
5. Trypsinierte Zellen werden in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt und mit PBS auf 15 ml aufgefüllt. Anschließend findet eine Zentrifugation bei 1200 UPM über 5 Minuten bei 4°C statt.
Die Trypsinwirkung wird gestoppt, zytotoxisches EDTA wird gebunden.

5. Der Überstand wird abgesaugt, das Zellpellet in PBS aufgenommen und erneut gewaschen wie in Schritt 5 beschrieben.

Reste von EDTA würden Wachstum verlangsamen.

6. Nach Verwerfung des Überstandes wird das Pellet in einem Eppendorf-Cup mit 150 µl PBS resuspendiert. Die Zellen sind nun fertig für die Transplantation (bis zur Transplantation Lagerung bei 37°C).

2.2.4 Transplantation

Die durch MACS-Analyse gewonnenen humanen CD133-einfach-positiven, aber auch CD133-/CD34-doppelt-positiven-Progenitorzellen werden im Rahmen einer Transplantation unter die rechte Nierenkapsel der SCID-Mäuse (insgesamt 13, 2 Transplantationssitzungen) gespritzt. Im Folgenden wird das Verfahren näher erläutert. Die renale Schädigung durch Anwendung des Ischämie/Reperfusion-Modells ist fotografisch dokumentiert worden.

Die Narkose wird für eine 25-g-schwere Maus wie folgt durchgeführt: In eine 1-ml-Spritze werden zuerst 0,2 ml Xylazin 2% (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf, Deutschland), dann 0,6 ml Ketamin 10% (Pharmanovo GmbH, Hannover, Deutschland) (entspricht 4 mg Xylazin und 60 mg Ketamin in 0,8 ml) aufgezogen. Um besser kleine Mengen injizieren zu können, wird diese Mischung mit 0,9-prozentiger steriler NaCl-Lösung 1:4 (v/v) versetzt. Die Spritze wird gut durchmischt und die Kanüle wird vor der ersten Injektion gewechselt. Es werden 0,15-0,2 ml dieser Anästhesie intraperitoneal injiziert.

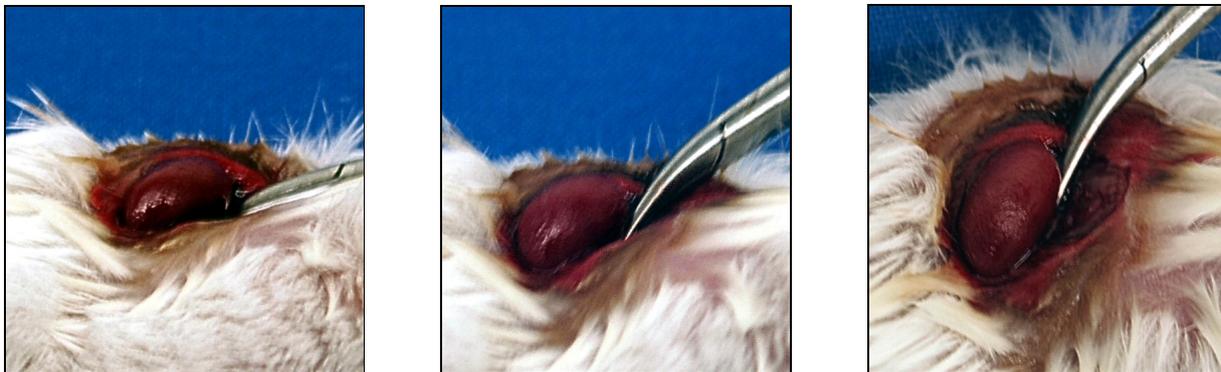
Der Vorteil dieser Vollnarkose liegt in der guten Analgesie und Muskelrelaxation mit nur leichter Atemdepression. Die Maus ist nach circa 10 Minuten für einen 30-minütigen Eingriff bereit und wacht nach circa 100 Minuten wieder auf.

Die Fellhaare der rechten Flanke werden rasiert. Es erfolgt die Inzision der rechten Flanke mit anschließender Lösung der rechten Niere aus dem Retroperitonealraum unter Zuhilfenahme einer anatomischen Pinzette nach Trennung von Fett- und Bindegewebskapsel.



Abbildungen 3-5: Maus nach Rasur der Fellhaare der rechten Flanke (linke Abbildung) sowie Zustand nach Inzision der Cutis (mittleres Bild) und Darstellung der rechten Niere nach ihrer Lösung aus dem Retroperitonealraum (rechtes Bild).

Nun wird die rechte Arteria renalis mit Hilfe der Arterienklemme über *mehrere Minuten* (nicht länger als 10 Minuten) vorsichtig ligiert und die Sauerstoffzufuhr somit unterbrochen. Es lässt sich erkennen, dass die Nierenfarbe von einem anfangs tief rot-bräunlichen Ton ein immer heller werdendes, blass-rötliches Aussehen annimmt.



Abbildungen 6-8: Fotografische Dokumentation der Unterbindung der rechten murinen Arteria renalis mittels einer Arterienklemme im zeitlichen Verlauf (über 5 Minuten). Erkennbar ist ein immer blasser werdender Farbton der Niere.

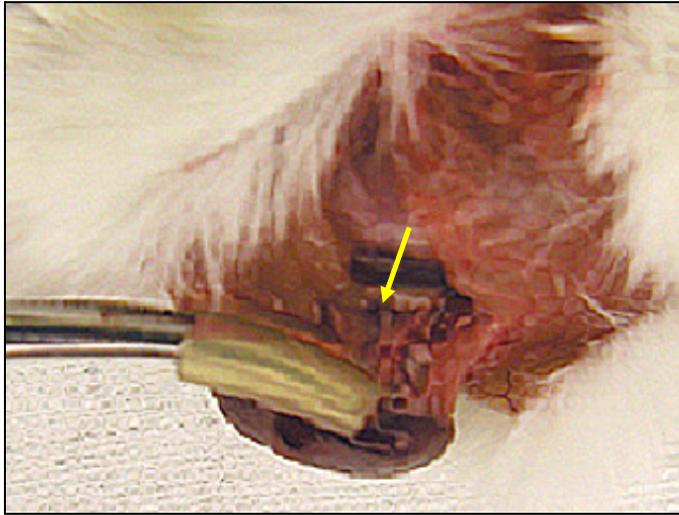


Abbildung 9: Darstellung der Arteria renalis der rechten Mäuseniere (Pfeil).

Zum Vergleich über das Ausmaß der Schädigung durch Hypoxie folgen an dieser Stelle Bilder einer murinen Niere, deren rechte Arteria renalis über einen Zeitraum von 25 Minuten abgeklemmt wird. Die anfangs dunkelbraune Niere ist nach 25 Minuten blass-rosa, vergleichbar mit der Farbe der murinen Cutis.

Anschließend wird diese Maus getötet und die geschädigte Niere umgehend zum Zweck der Gewebeaufbereitung und Anfertigung von Hämatoxylin-Eosin-Gewebeschnitten entnommen.



Abbildungen 10 und 11: Zum Vergleich: Mäuseniere vor (linke Abbildung) und nach Unterbrechung der Sauerstoffzufuhr (rechtes Bild). Die Niere ist 25 Minuten lang nicht mit Sauerstoff versorgt worden.

Nachfolgend werden die humanen hämatopoetischen Progenitorzellen des Phänotyps CD133⁺, gelöst in PBS, mit einer Diabetikerspritze (BD Micro-Fine™ Insulinspritze 0,3 ml, 0,3 x 8 mm) unter die Nierenkapsel injiziert. Jede Maus erhält dabei circa 1×10^6 Zellen (gelöst in 50 μ l PBS). Voraussetzung ist dabei das Arbeiten unter einer Sterilbank, um optimale Bedingungen zu garantieren.

Nach der Injektion der Zellen werden das Peritoneum und die Oberhaut jeweils durch Einzelknopfnähte wieder verschlossen.



Abbildung 12: Wiederverschluss des Peritoneums und der Oberhaut durch Einzelknopfnähte nach erfolgter Injektion der CD133-positiven Progenitorzellen.

Die Mäuse werden bis zu ihrem Erwachen aus der Narkose auf einer Wärmeplatte bei 37°C kreislaufstabil gehalten.

Bis zu der Entnahme der Nieren (nach circa 7 Wochen) wird eine möglichst lange - dem Gesundheitszustand der Mäuse angemessene - postoperative Verweildauer angestrebt. Daher werden die transplantierten Mäuse täglich gewogen, um eine frühzeitige Verschlechterung des Allgemeinzustandes oder auch eine tumoröse Veränderung der rechten Niere rechtzeitig bemerken zu können.

Es werden jeweils beide murinen Nieren entnommen, wobei die linken Nieren zum einen als Kontrollnieren genutzt und zum anderen ebenso auf das Vorhandensein von Stammzellen untersucht werden.

Als gesunde Kontrollniere dient eine komplett unbehandelte Maus; als Kontrollniere eines nicht durch Stammzellen behandelten Hypoxieschadens fungiert ebenfalls eine Maus. Es kommen sowohl männliche als auch weibliche Mäuse zum Einsatz sowie männliche und weibliche Stammzellen.

Für die FISH-Analyse werden männliche Stammzellen in eine weibliche Empfängermaus transplantiert, um anschließend das humane Y-Chromosom in der XX-Mäuseniere nachweisen zu können.

Nach Entnahme werden die Nieren in TissueTec® eingebettet und in flüssigem Stickstoff (-196°C) schockgefroren. Ihre Lagerung erfolgt bei -80°C.

Es werden 5-µm-Kryostatschnitte an einem Gefriermikrotom (Kryostat Jung CM 3000, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) hergestellt.

Anschließend erfolgt eine Fixierung in reinem Aceton (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei 4°C über 15 Minuten. Nach ihrer Lufttrocknung können die Schnitte bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

Zudem werden für die FISH-Analyse 2-µm-dicke Paraffinschnitte angefertigt.

2.2.5 Genehmigung der Versuche an lebenden Tieren

Auf der Grundlage von § 8 des Tierschutzgesetzes vom 25. Mai 1998 (BGBl.I.S.1105) erteilte die Bezirksregierung in Braunschweig die Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an lebenden Tieren unter dem Zeichen 509.42502/01-26.04 am 28.05.2003 für die Dauer von drei Jahren. Am 31.05.2006 ist der Antrag auf Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an lebenden Tieren unter dem Zeichen 33.42502/01-26.04 bis zum 31.05.2007 verlängert worden.

2.2.6 Laser-Scanning-Zytometrie

Die Objektträger-basierte Zytometrie (slide based cytometry, SBC) ist in den letzten Jahren parallel zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Zellen entwickelt worden. Für die SBC stehen heute mehrere Geräte zur Verfügung.

Bezüglich dieser Arbeit wird mit dem Gerät iCys® (Firma Compucyte, Cambridge, USA) gearbeitet. Bei diesem System besteht der Kern des Instrumentes aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop.

Gemeinsam mit anderen zytometrischen Verfahren ist der SBC die biochemische und physikalische Grundlage der Markierung relevanter Zellstrukturen (zum Beispiel nukleäre DNA, Rezeptoren oder Mitochondrien) anhand von Fluorochromen. Die Unterschiede finden sich jedoch bei der Detektion der Fluorochrome. Während die Probe bei der Durchflusszytometrie als Suspension vorliegen muss - nur so kann sie im Durchfluss die Detektionskammer passieren - liegt das Probenmaterial bei der SBC in verschiedener Form (beispielsweise als Gefrierschnitt, Zellkultur oder Nadelbiopsie) vor und wird per XY-Tisch an einem fest justierten Laser vorbeigefahren. In beiden Verfahren erfolgt die Detektion der Fluoreszenz dabei über einen Photomultiplier.

Das anregende Licht des iCYS-Gerätes stammt aus 1-3 Lasern. Dabei kommen ein Argon-Laser mit 488 nm, ein Helium-Neon-Laser mit 633 nm und ein Diodenlaser mit 405 nm zum Einsatz. Das Licht dieser Laser wird coaxial zu einem Teilerspiegel geführt. Dieser spaltet die emittierenden Teile der Fluoreszenz ab. Zwischen Teilerspiegel und Objekt verlaufen die Wege des anregenden Lichts und der emittierten Fluoreszenz gemeinsam, jedoch in unterschiedlicher Richtung zueinander.

Der Laserstrahl trifft dann auf einen oszillierenden Spiegel, der den Strahl so auslenkt, dass er auf dem Objektträger nicht punktförmig, sondern als Linie in y-Achse abgebildet wird. Daher der Name *Laser-Scanning-Zytometrie*. Die von den Zellen emittierte Fluoreszenz strahlt in alle Richtungen ab. Für die Detektion kann lediglich der Anteil verwendet werden, der in umgekehrter Richtung durch das Objektiv und über den oszillierenden Spiegel zum Teilerspiegel gelangt. Der Teilerspiegel blockt das am Objektträger reflektierte Licht der anregenden Laser und lässt das Spektrum der Fluoreszenz passieren. Die Fluoreszenz trifft nun auf 1-4 Filterwürfel. Die Filterwürfel bestehen aus je einem dichroischen Spiegel und einem Bandpass-Filter. Jeder dieser Filterwürfel spiegelt die entsprechende Fluoreszenz in einen Photomultiplier (PMT), der ein digitales Ausgangssignal generiert. Es können bis zu vier Spektralbereiche simultan gemessen werden. Das durch ein Objekt auf dem Objektträger antegrad gestreute Licht des Lasers (sogenanntes Vorwärtsstreulicht, forward scatter (FSC)) wird mit einer Photodiode unter dem Objektträger gemessen. Über der Photodiode ist ein kleiner Balken angebracht, um eine Signalentstehung des ungestreuten Lichtes zu vermeiden.

Die von den PMT's und der FSC-Photodiode generierten Signale werden mit dem Takt des oszillierenden Spiegel synchronisiert. So können sie einer definierten Flächeneinheit auf dem Objektträger zugeordnet werden. Das Signal pro Flächeninhalt wird rechnerisch in Pixel dargestellt, dessen Helligkeit in Graustufen die Höhe des Signals wiedergibt. In y-Achse werden die Pixel - entsprechend der Position der Laserlinie - als Linie dargestellt. In x-Achse wird dann eine an die

andere Linie gereiht, bis eine gewisse Fläche des Objektträgers gemessen ist. Für diese Fläche entsteht eine Pixel-per-Pixel-Map. Die Messung des Objektträgers verläuft also aus dreifacher Sicht schrittweise: Die zu messende Fläche des Objektträgers wird zunächst in Streifen entlang der x-Achse mit definierter Breite zur y-Achse dividiert, die Streifen werden in einzelne Abschnitte untergliedert und jeder Abschnitt wird in einzelne Laserlinien gesplittet.

Die Verarbeitung der Pixel-per-Pixel-Maps wird in dieser Arbeit mit dem Programm Cell[^]F® (Firma Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgeführt.

Im Rahmen dieser Dissertation wird über Laser-Scanning-Zytometrie nach humanen Y-Chromosomen gesucht. Als Material dienen Paraffinschnitte muriner Nieren, die entsprechend vorbereitet werden. Auf die 2- μ m-dicken Paraffinschnitte wird im Anschluss an die Hybridisierung mit einer Y-FISH-Sonde jeweils ein Tropfen des fluoreszenzstabilisierenden Einbettmediums Vectashield®-DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) aufgebracht. Durch DAPI ist die Visualisierung des Nucleus sichergestellt.

Das Präparat wird bei der Laser-Scanning-Zytometrie von einem Laserstrahl abgetastet und die Zellen werden über Vorwärtsstreulicht erkannt. Über jeder Zelle wird die Intensität gemessen und als Pixel gespeichert (circa 200 Messungen pro Zelle). Die Intensitätswerte werden als maximale Intensität und als Integral der Intensität gelistet. Jedes positive Ereignis wird nochmals relokalisiert und visuell kontrolliert. Damit werden die Spezifität der Markierung und die Morphologie der Zelle beurteilbar (Pachmann et al. 2001). Bei der eigentlichen Messung wird als Triggersignal die Kernfluoreszenz über DAPI verwendet. Mittels des Diodenlasers kann so jeder Zellkern im histologischen Präparat erkannt werden. Als zweites Signal wird eine grün markierte Y-FISH-Sonde eingesetzt. Bei der Messung werden in einem Dotplot die grünen Signale (Detektion über den Argon-Laser) auf der y-Achse, die Zellkernsignale auf der x-Achse dargestellt. Doppelt-positive Signale treten im Dotplot jetzt immer dann auf, wenn auf der Fläche eines Zellkerns auch ein Y-FISH-Signal im Grünkanal detektiert wird. Auf dem rechten oberen Quadranten wird ein Auswahlfenster aktiviert. Alle Ereignisse, die innerhalb des Auswahlfensters liegen, werden als Bilder in einer Galerie aufgeführt.

Eine präzise statistische Aussage über die Gesamtzahl der transplantierten Zellen innerhalb einer xy-Ebene ist somit möglich.

Laser-Scanning-Zytometrie ermöglicht es ebenso, die Stammzellfraktion nach MACS auf ihre Reinheit hin zu untersuchen.

Es werden 100 μl der mittels MACS separierten Zellfraktion abgenommen und mit 10 μl eines FITC (Fluoreszeinisothiocyanat)-konjugierten CD34-Antikörpers (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) sowie 10 μl eines PE (Phycoerythrin)-konjugierten CD133-2-Antikörpers (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) über 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird zweimal mit cRPMI 1640-Medium gewaschen (1200 UPM, 20°C, 15 Minuten). Die Zellsuspension wird auf einen Objektträger pipettiert und bei 60°C verdampft. Es erfolgt eine Fixierung mit 70-prozentigem Methanol, um nachfolgend eine Färbung und zugleich ein Eindeckeln mit Vectashield®-DAPI durchführen zu können. Der Objektträger wird mit einem Deckglas versehen und die Ränder mit Eukitt® verschlossen.

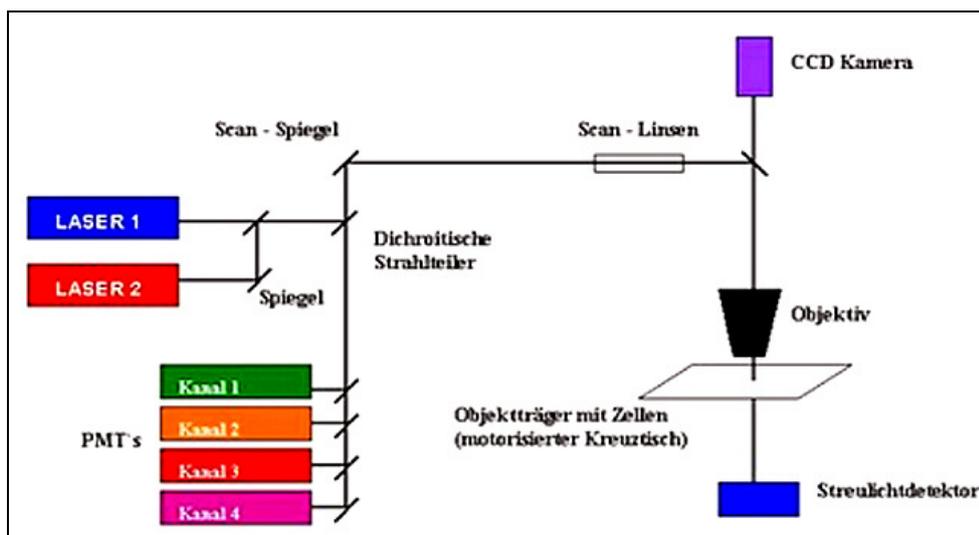


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips der Laser-Scanning-Zytometrie.

(Quelle: <http://www.uni-leipzig.de/izkf> → Core Units → Z10 Lösche: Fluoreszenz-Technologien → Zytometrie → objektträgergebundene Zytometrie)

2.2.7 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS)

Die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting, FACS) ermöglicht es, Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und emittierter Fluoreszenzstrahlung zu detektieren. Hierdurch lassen sich Größe, Granularität und die Expression von Oberflächenmolekülen - in diesem

Fall CD133 und CD34 als Marker von hämatopoetischen Progenitorzellen - bestimmen und grafisch darstellen. Analysiert werden die Zellen durch den Einsatz Fluoreszenzfarbstoff-markierter monoklonaler Antikörper. Die Zellsuspension wird in einer Sequenz von Einzelzellen - sozusagen gänsemarschartig - im rechten Winkel an einem Laser als Lichtquelle mit Geschwindigkeiten zwischen 200 und 2000 Zellen/Sekunde, nach Gerätetyp auch bis zu 50000 Zellen/Sekunde, vorbeigeführt. Dieser Laser regt den am jeweiligen Antikörper gekoppelten Farbstoff an. Die Zellen reflektieren das auftreffende Licht in unterschiedlicher Art und Weise (Streulicht). Das in einem geringen Winkel ($3-10^\circ$) reflektierte Licht wird als Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) bezeichnet, das um 90° reflektierte Licht als Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC). FSC korreliert mit der Zellgröße, SSC mit Granularität und Membranfaltung. Die jeweils charakteristische Lichtstreuung der verwendeten Farbstoffe wird durch einen optischen Interferenzfilter nach Wellenlängen aufgetrennt und durch Fotodetektoren gemessen. Die den physikalischen und molekularen Eigenschaften einer Zelle entsprechenden Lichtsignale werden für jede einzelne Zelle in einer multiparametrischen Messung in einen Datenspeicher geschrieben. In einem weiteren Schritt werden die gespeicherten Daten ausgewertet.

Die FACS-Analyse ermöglicht außerdem eine Abschätzung des Expressionsgrades der Oberflächenmarker einer Zelle, da die Intensität der Emission der Zahl der hierbei durch direkte Immunfluoreszenz gekoppelten Antikörper direkt proportional ist.

Anhand einer zweidimensionalen Darstellung kann das Ergebnis optisch erfasst werden:

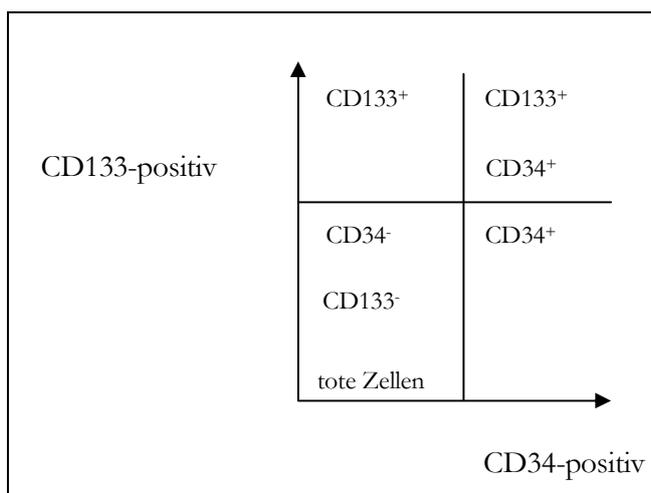


Abbildung 14: Schematische Darstellung der FACS-Auswertung. Zu erkennen ist die Verteilung der aus Nabelschnurvollblut gewonnenen CD133- und CD34-positiven Progenitorzellen auf die vier Quadranten.

2.2.8 Fluoreszenzfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die sich anschließende fluoreszenzmikroskopische Betrachtung der Schnitte erfolgt nun als Vorbereitung eine Immunfluoreszenzfärbung der Schnitte durch einen FITC-konjugierten monoklonalen Antikörper, der sich gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) richtet; HLA ist gleich humanes Leukozyten-Antigen. Des Weiteren werden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid) (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) markiert. Bei der Färbung kommen sowohl behandelte als auch unbehandelte murine Nieren zum Einsatz.

Protokoll der Färbung:

- Der Antikörper wird 1:30 mit PBS verdünnt und mit Hilfe einer Pipette auf die Schnitte gegeben; Inkubation für eine Stunde bei 37°C im Dunkeln. Bei dem gesamten Färbeprozess ist sorgfältig darauf zu achten, dass der Antikörper möglichst wenig Licht ausgesetzt wird - Aufbewahrung der Schnitte während des Färbeprozesses daher in einer feuchten dunklen Kammer.
Anmerkung: Um eine optimale Konzentration des Antikörpers zu erreichen, sind zuvor drei unterschiedliche Verdünnungsstufen, nämlich 1:10, 1:30 und 1:50 getestet worden, wobei sich eine Verdünnung von 1:30 bei der späteren Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop als geeignetste Variante bezüglich des Verhältnisses von spezifischer Färbung und Hintergrundfärbung erweist.
- Anschließend werden die Schnitte zweimalig mit PBS über 10 Minuten gewaschen.
- Nun erfolgt eine Zellkernfärbung mit DAPI. Nachdem DAPI in einer Konzentration von 1:50 auf die Schnitte aufgebracht worden ist, erfolgt eine Inkubation über 15 Minuten bei 37°C.
- Kurzes Waschen der Schnitte über einige Sekunden in PBS.
- Eindeckeln der Schnitte mit Mowiol® und Abdichten der Seitenränder mit Eukitt®.

Bei jedem Färbeprozess kommen Positivkontrollen humanen Ursprungs (zum Beispiel A498-Tumorzellen oder Drüsengewebe wie Tonsille oder Thymus) zum Einsatz. Das humane Drüsengewebe ist freundlicherweise von dem Zentrum für Pathologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt worden. A498 sind sich sehr schnell vermehrende menschliche Nieren-Tumorzellen.

Es werden Zytospins (Zytozentrifuge der Firma Shandon, Cheshire, England) angefertigt, wodurch diese Zellen auf einen Objektträger gelangen.

Es wird das Fluoreszenzmikroskop IX71 (Firma Olympus Optical Co. GmbH, Hamburg, Deutschland) eingesetzt.

Grundlage eines Fluoreszenzmikroskops ist die Eigenschaft unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, durch Bestrahlung mit kurzwelligem oder ultraviolettem Licht angeregt zu werden und längerwelliges Licht auszusenden.

Folgende Filter werden bei dieser Arbeit verwendet:

Blaue Fluoreszenzen betreffend (zum Beispiel über DAPI) wird ein Bandpassfilter eingesetzt. Das Anregungsmaximum liegt bei 365 nm Wellenlänge, das Emissionsmaximum bei 420 nm.

Rote Fluoreszenzen (beispielsweise über PE) werden mit einem Langpassfilter angeregt. Das Anregungsmaximum findet sich bei 546 nm Wellenlänge, das Emissionsmaximum bei 590 nm.

Um grüne Fluoreszenzen (zum Beispiel über FITC) zu erzielen, wird ein Bandpassfilter (für Exzitation und Emission) verwendet. Das Anregungsmaximum liegt bei 475 nm Wellenlänge, das Emissionsmaximum bei 530 nm.

Für die Darstellung der FISH-Fluoreszenzen (hier Spektrum grün) kommt ein spezieller Schmalbandfilter der Firma Chroma (vertrieben durch AHF Filtertechnik, Tübingen, Deutschland) zum Einsatz. Dieser Filtersatz ist hart beschichtet und verfügt über eine extrem hohe Transmissionseffizienz (circa 98%). Das Anregungsmaximum findet sich bei 509 nm, das Emissionsmaximum bei 538 nm.

Software

Für eine digitale Bilddarstellung und Analyse wird wie bei der Laser-Scanning-Zytometrie das Computer-Programm CELL[^]F[®] verwendet. Durch Verbindungsschnittstellen für Mikroskop und Kamera können die am Mikroskop betrachteten Bilder direkt am Computerbildschirm sichtbar gemacht und durch vielfältige Funktionsmodi weiterverarbeitet werden.

Absorptions- und Emissionswellenlängen der eingesetzten Fluorochrome:

<i>Fluoreszenzkanal</i>	<i>Farbstoff</i>	<i>Absorptionsmaximum</i>	<i>Emissionsmaximum</i>
grün	Fluoreszein- isothiocyanat (FITC)	475 nm	530 nm
	Y-Chromosom-Sonde CEP (Centromer- Sondensignal)-Y, Spektrum grün	509 nm	538 nm
rot	Phycoerythrin (PE)	546 nm	590 nm
blau	4',6-Diamidino-2- Phenylindol- Dihydrochlorid (DAPI)	365 nm	420 nm

2.2.9 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Gewebeschnitten hypoxisch geschädigter muriner Nieren

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) (Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) ermöglicht es, verschiedene Strukturen eines feingeweblichen Schnittes anzufärben. Als eine der am weitesten verbreiteten Routinefärbemethoden für morphologische Untersuchungen basiert sie auf zwei verschiedenen Einzelfärbungen.

Hämatoxylin ist ein natürlicher Farbstoff aus dem Blauholzbaum. Um seine färbende Wirkung auf die Zellkerne entfalten zu können, muss es zu Hämalaun (basischer Hämalaun) aufbereitet werden.

Anschließend erfolgt die Zytoplasma-Färbung mittels Eosin in einer alkoholischen oder wässrigen Lösung. Bei Eosin handelt es sich um einen synthetischen sauren Farbstoff, der eosinophile Strukturen, vor allem die Zellplasmaproteine, rot färbt.

Durch weitere Spülschritte mit Alkohollösungen in aufsteigender Konzentration bis hin zum reinen Alkohol wird der Gewebeschnitt entwässert und daraufhin in einem organischen Lösungsmittel wie etwa Xylol geklärt.

Nach Eindeckeln des Gewebeschnittes kann dieser lichtmikroskopisch betrachtet werden.

2.2.10 Gewinnung humaner RNA mittels Laser-Mikrodissektion

Mittels Laserenergie (PALM® MicroBeam, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Bernried, Deutschland) werden die durch Fluoreszenzmikroskopie detektierten "Stammzellareale" vom Objektträger ausgeschnitten und in Mineralöl aufgenommen. Aus dem ausgeschnittenen Material wird die für eine PCR benötigte RNA isoliert.

Der eingesetzte PALM® MicroBeam besteht aus einem Forschungsmikroskop mit eingekoppeltem Laser, angeschlossenem Computer und Kamera. Die Kamera überträgt die Bilder in Echtzeit an den Computer.

Bei der Laser-Mikrodissektion wird ein kohärent gepulster Laserstrahl (üblicherweise eines Diodenlasers) von unten über ein Objektiv eines Mikroskops auf die Probe fokussiert. Durch die hohe Energie des Lichtes wird das Gewebe im Fokus zerstört. Die gewünschte Schnittstelle entsteht durch das Aneinanderreihen vieler Pulse. Der Laser trifft über ein sehr kurzes Zeitintervall von etwa 4 ns auf die Probe. Ein Wärmetransport außerhalb des Fokusbereiches wird somit reduziert. Mit Hilfe des gepulsten Lasers kann nach dem Trennen der gewünschten Areale von der Umgebung durch "Laserdruck" (höhere Energie) das nun freie Areal per Licht auf einen sich darüber befindenden Mineralöltropfen (Oberflächenspannung) befördert werden. Die Oberflächenspannung des sterilen Öltropfens nimmt das gewünschte Zellmaterial auf und dieses kann anschließend für weitere Untersuchungen verwendet werden.

2.2.11 RNA-Isolation mit dem *Invisorb® RNA-Kit I* der Firma Invitex

Zur RNA-Isolierung wird das Invisorb® RNA-Kit I (Firma Invitex, Berlin, Deutschland) genutzt. Als Vorbereitung wird die Zentrifuge vorgekühlt und der Heizblock auf 65°C vorgeheizt. Nach kurzer Zentrifugation in einem Eppendorf-Cup wird der Mineralöltropfen mit dem darin enthaltenen Zellmaterial in 300 µl des Lysis-Puffers R aufgenommen und über 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es werden 15 µl der Carrier-Lösung zugeben und alles per Vortexer durchmischt. Es erfolgt eine Inkubation über 10 Minuten auf Eis mit anschließender Zentrifugation bei 15000 UPM 5 Sekunden lang. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl des Waschpuffers resuspendiert und erneut bei 15000 UPM über 5 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und ein weiterer Waschschriff mit dem Waschpuffer durchgeführt. Nach der Zentrifugation

wird der Überstand vollständig abgenommen und das Eppendorf-Cup geöffnet zur Trocknung in den Heizblock gestellt. Nachfolgend wird das Pellet in 50 µl des DEPC-Wassers aufgenommen und resuspendiert. Das Cup wird ein weiteres Mal, jedoch nun in geschlossenem Zustand (→ Denaturierung), über 10 Minuten in den Heizblock gestellt und 1 Minute lang bei 15000 UPM zentrifugiert. Als letzter Schritt erfolgt die Abnahme des Überstandes und dessen Überführung in ein neues Cup mit anschließender Lagerung bei -80°C bis zur weiteren Nutzung.

2.2.12 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) mit dem Qiagen® OneStep-RT-PCR-Kit

Bei der RT-PCR kommt das Qiagen® OneStep-RT-PCR-Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) zum Einsatz.

Ansatz für eine Probe:

- DEPC-Wasser	2,86 µl
- RT-Puffer 5x	2,0 µl
- Q-Solution	2,0 µl
- DNTP-Mix	0,4 µl
- Enzym-Mix	0,4 µl
- RNase-Inhibitor	0,04 µl

- Primer vorwärts	0,2 µl
- Primer rückwärts	0,2 µl

- RNA-Templat	1,9 µl
---------------	--------

Die oben aufgeführten Substanzen werden auf Eis gekühlt und in der jeweils angegebenen Menge in ebenfalls vorgekühlte 0,2-ml-PCR-Gefäße pipettiert. Anschließend wird das aus den murinen Nieren mittels des gepulsten Lasers gewonnene RNA-Material hinzugefügt. Es werden jeweils fünf Gefäße mit RNA-Material einer mit CD133-positiven Progenitorzellen behandelten Maus, fünf Gefäße mit RNA-

Material der kontralateralen unbehandelten Niere derselben Maus und fünf Gefäße mit RNA-Material der Niere einer unbehandelten gesunden Maus versetzt. Jedes Gefäß wird kurz zentrifugiert und in das PCR-Gerät (Mastercycler, Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gestellt. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wird die jeweilige RNA in DNA umgeschrieben. Die komplementäre DNA wird durch die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt, und zwar unter Einsatz des folgenden Temperaturprofils:

50°C	95°C	94°C	58°C	72°C	72°C	4°C
35 Minuten Transkription	15 Minuten Heißstart	1 Minute Denaturierung	1½ Minuten Hybridisierung	1 Minute Stopp	10 Minuten Stopp	1 Minute Ende

Eigentlicher Zyklus

Zyklusdauer: 33 Zyklen

2.2.13 Agarose-Gelelektrophorese

Die mittels PCR amplifizierte DNA-Stücke werden elektrophoretisch in einem 2-prozentigen Agarose-Gel aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Es werden als Vorbereitung 2 g der Agarose abgewogen, mit TAE-Puffer auf 100 g aufgefüllt und in einer Mikrowelle so lange erhitzt, bis die Lösung völlig klar ist beziehungsweise sich die Agarose vollständig gelöst hat. Zwischenzeitlich wird ein Kamm für die Geltaschen in die Gelkammer eines Elektrophoresegerätes (Firma Life Technologies, Gaithersburg, USA) eingesetzt.

Nachdem sich die Lösung auf etwa 40°C abgekühlt hat, wird sie in die Gelkammer gegossen und ihre vollständige Polymerisierung abgewartet.

Anschließend wird das Gel gleichmäßig mit TAE-Puffer bedeckt und der Kamm für die Geltaschen entfernt.

Die unterschiedlichen Proben werden nun mit einem Probenbeladungs-Puffer versetzt. Jeweils 5 µl des PCR-Produktes werden in 2,5 µl des Puffers aufgenommen und in die jeweilige Geltasche pipettiert.

Als Längenstandard werden 2,5 µl einer DNA-Leiter, ebenfalls versetzt mit 2,5 µl des Probenbeladungs-Puffers, verwendet. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 100 Volt über circa eine Stunde. Abschließend wird das Gel in einer Ethidiumbromidlösung über einen Zeitraum von

etwa 10 Minuten gefärbt und die Banden in einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht sowie fotografisch festgehalten.

Anhand der Leiter kann die jeweilige Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch das Gel, da die Poren des Agarose-Gels diesen weniger Widerstand entgegenbringen.

2.2.14 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Als weitere Nachweismethode humaner CD133-positiver Progenitorzellen dient die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Aus dem Nabelschnurblut eines *männlichen* Spenders isolierte Progenitorzellen werden in *weibliche* Mäusenieren transplantiert. Die Mäuse sind zu diesem Zeitpunkt 14 Wochen alt. Die in Paraffin eingebetteten Nierengewebeschnitte weiblicher Mäusenieren werden mit einer humanen Y-FISH-Sonde (Firma Vysis Inc., Downers Grove/Illinois, USA) hybridisiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch unter Detektion des humanen Y-Chromosoms als Nachweis humaner Zellen ausgewertet. Dabei richtet sich die Sonde sowohl gegen das Centromer als auch gegen beide Arme des Y-Chromosoms. Hierdurch steigt die Signalintensität.

Die Technik der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erstreckt sich über einen Zeitraum von zwei Tagen. Vorbereitend werden die Paraffinschnitte über Nacht bei 37°C getrocknet.

Protokoll der Färbung:

- Paraffinschnitte (2 µm) auf Super-Frost-Plus-Objektträgern.
- Schnitte über Nacht bei 37°C trocknen lassen.

1.Tag:

- Nierengewebeschnitte 2 Stunden bei 60°C inkubieren.
- 2 x 15 Minuten in Roti-Histol entparaffinieren.
- Für jeweils 1½ Minuten absteigende Alkoholreihe mit 100%, 85% und 70%.
- Kurzes Abspülen in Wasser.
- Für 2 Stunden in PBS bei 4°C waschen.

- 10 Minuten in 1-molarer NaSCN-Lösung bei 80°C denaturieren (DNA-assoziierte Proteine, zum Beispiel Histone, die quervernetzt sein können, werden denaturiert).
- 3 x 5 Minuten mit H₂O bei Raumtemperatur auf dem Schüttler waschen.
- 5 Minuten bei 37°C in H₂O waschen.
- 30 Minuten in frisch angesetzter Pepsin-Lösung bei 37°C inkubieren (Proteinverdau).
- 3 x 5 Minuten mit 1x PBS bei Raumtemperatur auf dem Schüttler waschen.
- 3 x 10 Minuten in MeOH/Eisessig 3:1 inkubieren.
- 5 Minuten 70%-EtOH auf Eis.
- 5 Minuten 80%-EtOH auf Eis.
- 5 Minuten 100%-EtOH bei Raumtemperatur.
- Schnitte lufttrocknen lassen.
- Schnitte bei 75°C über 5 Minuten denaturieren.
- 7 Minuten bei 56°C Proteinverdau mit Proteinase-K-Lösung.
- 5 Minuten 70%-EtOH auf Eis.
- 5 Minuten 80%-EtOH auf Eis.
- 5 Minuten 100%-EtOH bei Raumtemperatur.
- Schnitte lufttrocknen lassen.
- Denaturierung der Schnitte für 5 Minuten bei 75°C.
- 10 µl der Sondenlösung (enthält Sonde gegen das humane Y-Chromosom, Spektrum grün) auf die denaturierten Schnitte im Dunkeln pipettieren.
- Objektträger eindeckeln.
- Über Nacht in einer feuchten Kammer unter Lichtabschluss bei 37°C hybridisieren.

2. Tag:

- 5 Minuten bei 72°C in 2x SSC inkubieren.
- Deckgläser entfernen.
- 4 x 5 Minuten bei 45°C in 50%-Formamid/2x SSC-Lösung inkubieren.
- 3 x 5 Minuten in 0,1x SSC bei 60°C spülen.
- 1 ml des Einbettmediums (mounting medium) in das braune Röhrchen mit dem Reagenz gegen das Ausbleichen der Fluorochrome (antifade reagent) pipettieren und resuspendieren; daraus

20 µl entnehmen und mit 15 µl Vectashield®-DAPI pro Objektträger mischen; anschließend auf die Schnitte geben.

- Objektträger eindeckeln und mit Eukitt® die Ränder verschließen.
- Abweichend: Nach Spülen in SSC, DBA-Lectin-Rhodamin-Farbstoff in einer Verdünnung von 1:70 auf die Schnitte geben und 20 Minuten lang in dunkler Kammer bei Raumtemperatur inkubieren lassen.
- Schnitte kurz in PBS waschen.
- DAPI in einer Verdünnung von 1:50 auf die Schnitte geben und über 15 Minuten in dunkler Kammer bei 37°C inkubieren lassen.
- Schnitte kurz in PBS waschen.
- Eindeckeln mit Mowiol® und verschließen der Seitenränder mit Eukitt®.

Dolichos-Biflorus-Agglutinin (DBA)-Lectin-Rhodamin-Färbung:

DBA-Lectin-Rhodamin (Vector Laboratories Inc., Burlingame/Kalifornien, USA) wird als zusätzliche Färbung gewählt, da hierdurch zwischen distalen Tubuli (werden gefärbt) und proximalen Tubuli (werden nicht gefärbt) differenziert werden kann.

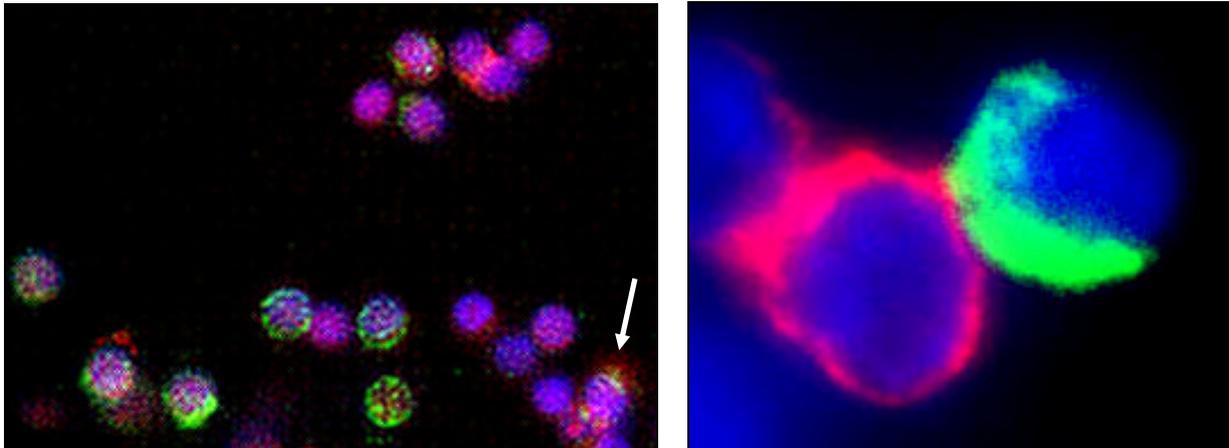
3 Ergebnisse

3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Reinheit per MACS selektierter CD133⁺-Progenitorzellen

Die aus dem Nabelschnurvollblut durch MACS gewonnenen CD133-positiven hämatopoetischen Progenitorzellen werden anschließend auf ihre Reinheit hin untersucht. Reinheit bedeutet hierbei, in welchem Grad in der Probe nach MACS auch tatsächlich nur CD133-einfach- beziehungsweise CD133- und CD34-doppelt-positive Progenitorzellen enthalten sind. Auch das Eluat wird als Kontrollprobe analysiert, da dieses keine CD133-positiven Zellen mehr enthalten sollte.

Die Durchflusszytometrie basiert in diesem Fall auf Fluoreszenzfärbung, denn es werden Antikörper eingesetzt, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind und dadurch in der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden können. Für die durchflusszytometrischen Analysen am FACS-Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) sind die Zellen mit einem PE-konjugierten anti-human-CD133-2-Antikörper sowie mit einem FITC-konjugierten anti-human-CD34-Antikörper nach Herstellerprotokoll markiert worden. Da das Epitop CD133-1 bereits bei der MACS durch magnetisch aktivierte Partikel besetzt worden ist, erfolgt die fluoreszenzbasierte Markierung an einem zweiten Epitop, und zwar CD133-2. Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden.

Die Durchflussgeschwindigkeit der Zellen durch die Säule im Magnetfeld wird durch drei Faktoren reduziert. Erstens werden die LS⁺/MS⁺- Säulen vorgekühlt, zweitens wird das Lumen der MACS-Säule durch die Befestigung einer 20G-Nadel (Sterican®, 0,9 x 50 mm) an den Luer-Adapter verringert und drittens werden zwei Säulenläufe durchgeführt. Durch diese technischen Feinheiten kann eine Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen zwischen 99,2% und 99,7% ermittelt werden.

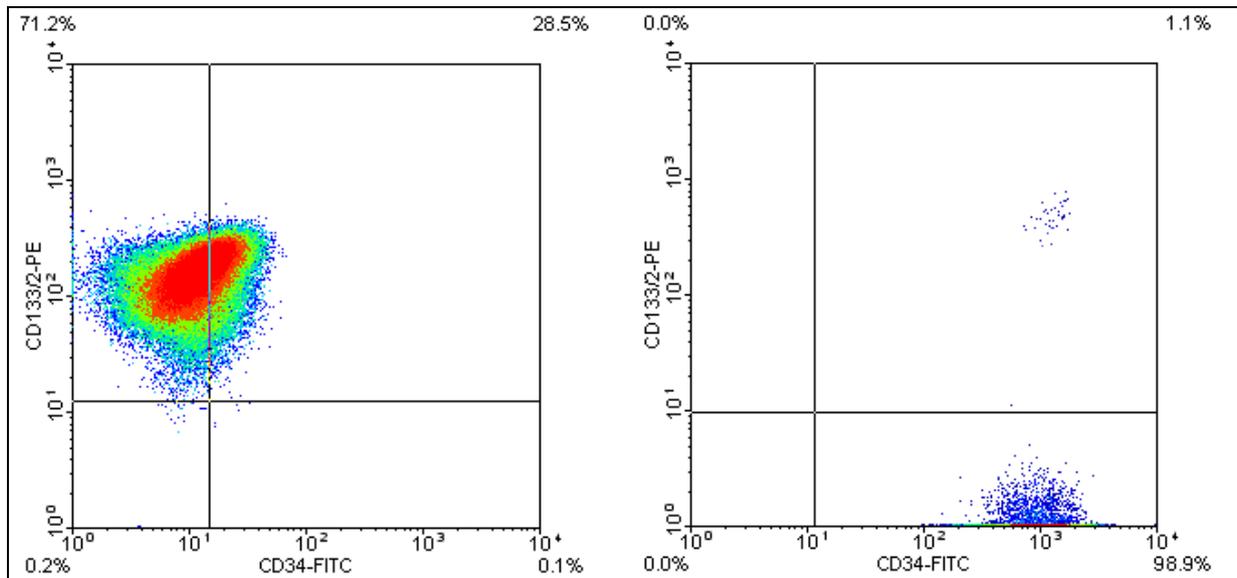


Abbildungen 15 und 16: Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten Zellmembranfärbung mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper (40x Vergrößerung linkes Bild, vergrößerter Bildausschnitt rechts): Durch Verwendung der Fluoreszenz-markierten Antikörper emittieren die CD133⁺-Zellen nach Exzitation rot, die CD34⁺-Zellen grün. Der Zellkern ist mit DAPI gefärbt worden und leuchtet fluoreszenzmikroskopisch blau. Der Pfeil markiert eine CD133-/CD34-doppelt-positive Zelle, die durch die Überlagerung der rötlichen und grünlichen Emissionen gelb erscheint.

Die am FACS-Calibur gewonnenen Daten der CD133-positiven Zellfraktion nach MACS sowie des Eluates werden nachfolgend grafisch dargestellt. Unter Windows-basierten Computern wird zur Auswertung der mittels Durchflusszytometrie durchgeführten Bestimmungen das Programm WinMDI (Freeware, Universität La Jolla/Kalifornien, USA) in der Version 2.9 eingesetzt. Erfolgt die Auswertung auf einem Macintosh-Computer, so wird die Software FlowJo Version 8.71 verwendet.

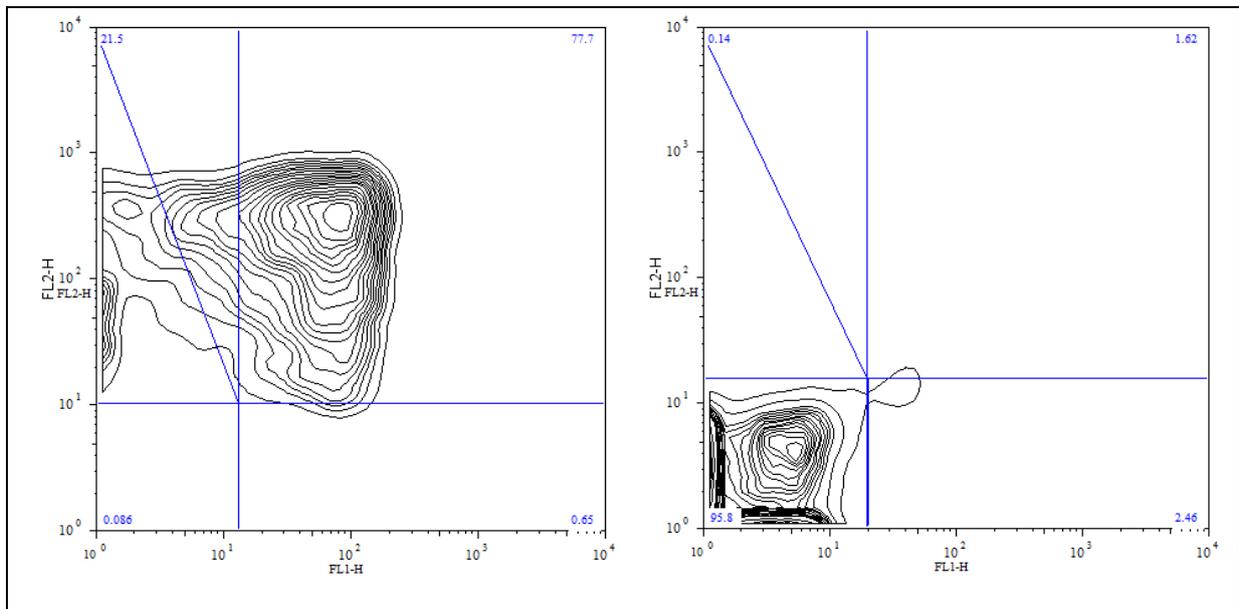
Die statistische Darstellung als Punktwolken-Diagramm wird mit Hilfe der Auswerte-Software WinMDI 2.9 (Freeware, im Internet über die Internetseite der FACS-Abteilung am Scripps Research Institute in La Jolla/Kalifornien, USA erhältlich) erstellt.

Es kann eine Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen von 99,7% gezeigt werden, worunter 71,2% CD133-einfach- und 28,5% CD133-/CD34-doppelt-positiv sind. Das Eluat enthält überwiegend (98,9%) CD34-einfach-positive Progenitorzellen.



Abbildungen 17 und 18: Dot-Plot-Darstellung (Punktwolken-Darstellung) der durch FACS gemessenen Reinheit per MACS selektierter CD133-positiver Zellpopulationen: Es wird - wie in der linken Abbildung erkennbar - insgesamt eine Reinheit CD133-positiver Zellen von 99,7 % erzielt (nach doppeltem Säulenlauf unter optimierten Bedingungen). Darunter befinden sich 71,2% CD133⁺CD34⁻- und 28,5% CD133⁺CD34⁺-Zellen. 0,2% der Zellen sind tote oder ungefärbte Zellen; 0,1% der Zellen sind CD133⁻CD34⁺. Im Eluat (rechte Grafik) sind 98,9% CD133⁻CD34⁺, die übrigen 1,1% sind CD133⁺CD34⁺, erklärbar durch eine Sättigbarkeit der Säulen durch ein zu hohes Zellangebot.

Von einer weiteren Nabelschnurblutprobe, die per MACS über den Zelloberflächenmarker CD133-1 isoliert worden ist, wird eine Probe für die Durchflusszytometrie abgenommen und eine weitere Probe derselben Blutprobe wird direkt aus dem vollen Nabelschnurblut nach Dichtegradientenzentrifugation und Erythrozytenlyse als Kontrolle verwendet. Die am FACS-Calibur gewonnenen Daten werden mit der FlowJo Software (Version 8.7.1 für MAC OS-X) ausgewertet und als Contour-Plot ausgegeben. 99,2% der Zellen sind positiv für den Marker CD133. Darunter befinden sich 77,7% CD133⁺/CD34⁻-doppelt-positive und 21,5% CD133⁺-einfach-positive Progenitorzellen.



Abbildungen 19 und 20: Contour-Plot-Darstellung der Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen nach MACS.

Linke Abbildung: 77,7% der mittels MACS separierten Zellen sind CD133⁺CD34⁺, 21,5% sind CD133⁺CD34⁻. Damit ergibt sich eine Reinheit der CD133-positiven Population von 99,2% (nach doppeltem Säulenlauf unter optimierten Bedingungen). Die Kontamination durch einzelne CD34- positive Zellen beträgt 0,65%. 0,086% sind tote oder nicht gefärbte Zellen.

Rechte Abbildung: Vor der Anreicherung mittels MACS-Verfahren befinden sich im Nabelschnurblut 2,46% CD34⁺CD133⁻ Zellen, 1,62% der Zellen sind CD34⁺CD133⁺ und nur 0,14% sind CD133⁺CD34⁻.

3.2 Auswertung der Reinheit von CD133⁺-Progenitorzellen durch Laser-Scanning-Zytometrie als additives Verfahren zur Durchflusszytometrie

Die Analyse der mittels Laser-Scanning-Zytometer erhobenen Daten erfolgt mit dem zur Ausstattung gehörenden Programm iCYS und iBrowser (Firma Compucyte, Westwood/Massachusetts, USA).

Die Laser-Scanning-Zytometrie wird als noch relativ junge Methode alternativ zur FACS eingesetzt, um die Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen nach MACS zu ermitteln. Es kann eine Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen von 99% nachgewiesen werden. 92% dieser Zellen sind CD133-einfach-positiv und 7% CD133-/CD34-doppelt-positiv.

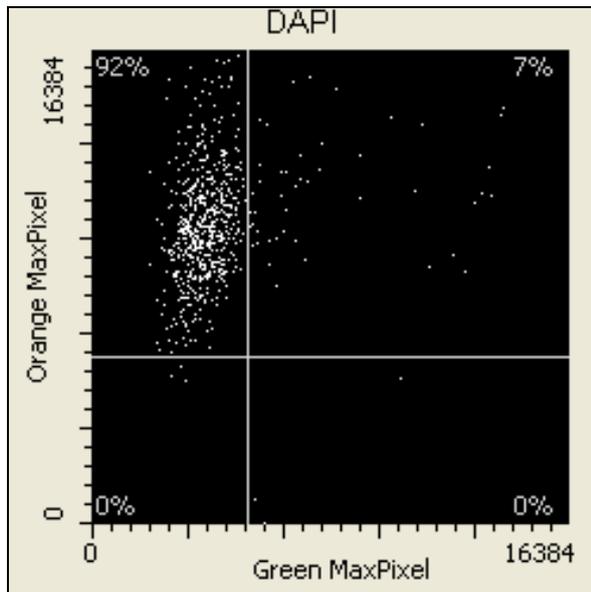
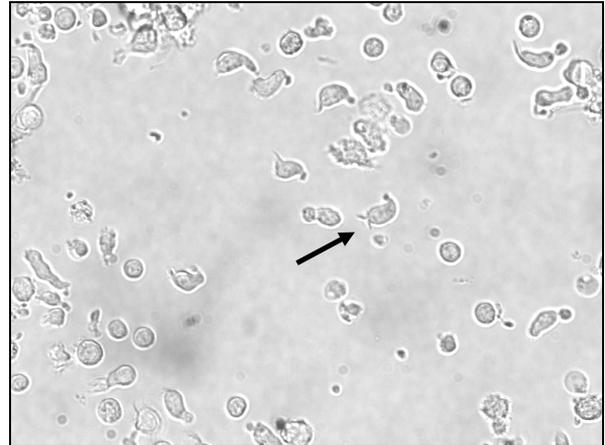
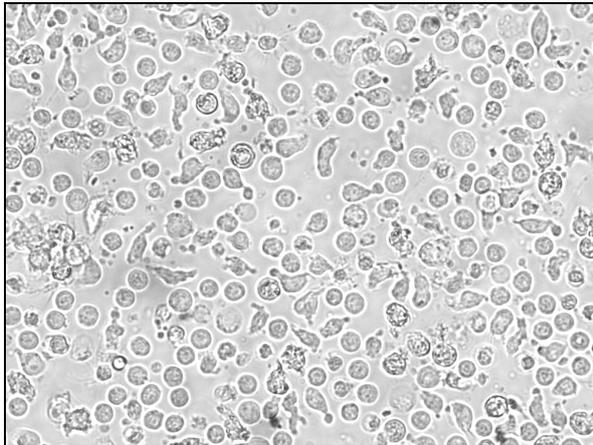


Abbildung 21: Dot-Plot-Darstellung (Punktwolken-Darstellung) der mittels Laser-Scanning-Zytophotometrie ausgewerteten Reinheit der Zellfraktion nach MACS: Es kann eine Reinheit von insgesamt 99% humaner CD133-positiver Progenitorzellen erzielt werden. Darunter befinden sich 92% CD133⁺CD34⁻ und 7% CD34⁺CD133⁺-Zellen. Das restliche 1% verteilt sich auf die vier Quadranten, da durch das Laser-Scanning-Zytophotometer nur *ganze* Prozente erfasst werden und keine Kommastellen.

3.3 Differenzierung von Stammzellen in Kultur bei 37°C

Es werden lichtmikroskopische Aufnahmen bei 37°C kultivierter CD133-positiver hämatopoetischer Stammzellen angefertigt. Zu erkennen ist, dass die Stammzellen nach 5-tägiger Inkubation Filo- und Lobopodien entwickelt haben, mit deren Hilfe sie sich fortbewegen oder an den Plastikboden der Kulturflasche anhaften können. Ebenfalls sind sich teilende Stammzellen unter den Zellen sichtbar.



Abbildungen 22 und 23: Humane Stammzellen nach 1-tägiger Inkubation bei 37°C. Zu erkennen ist bei einigen Zellen die Entwicklung erster Zellausläufer (Pfeil zeigt beispielhaft auf eine Zelle) (40x Vergrößerung).

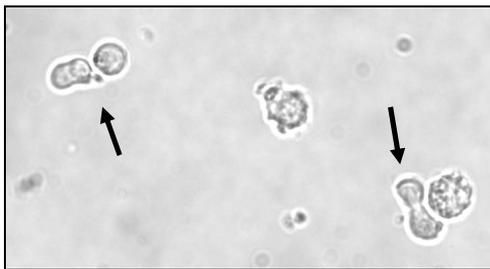
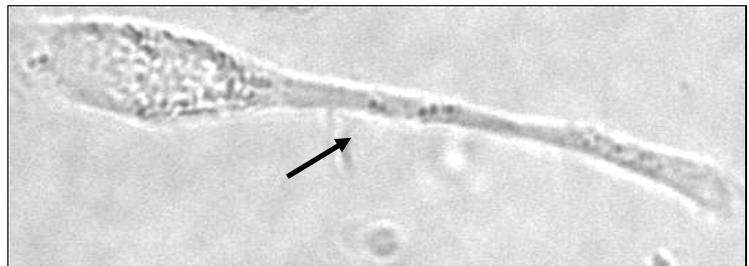
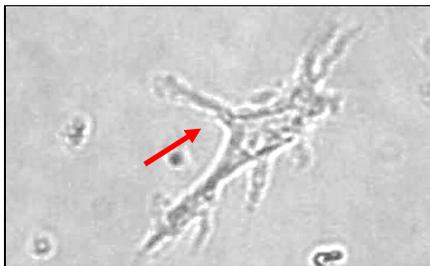


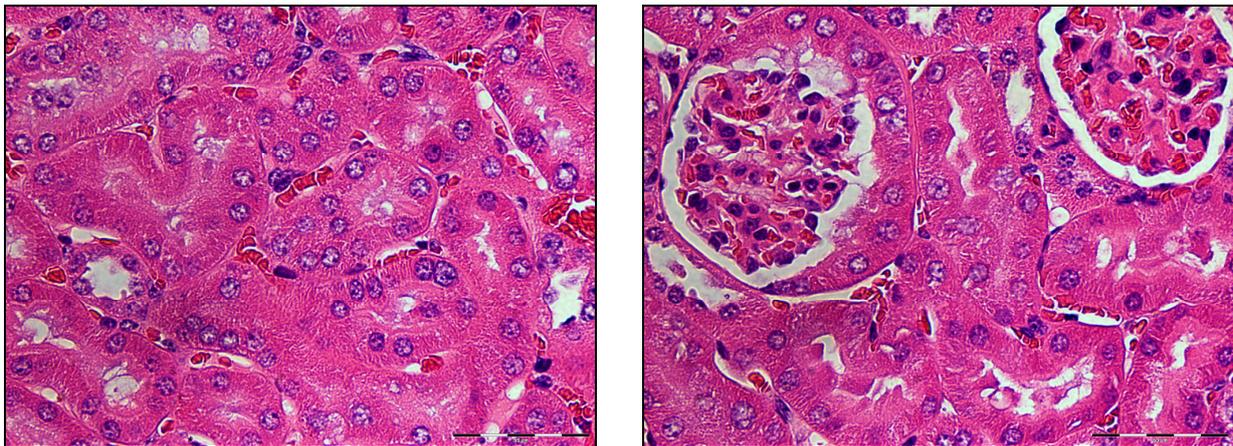
Abbildung 24: Lichtmikroskopische Aufnahmen sich teilender Stammzellen nach 1-tägiger Inkubation (Markierung durch Pfeile) (vergrößerter Bildausschnitt).



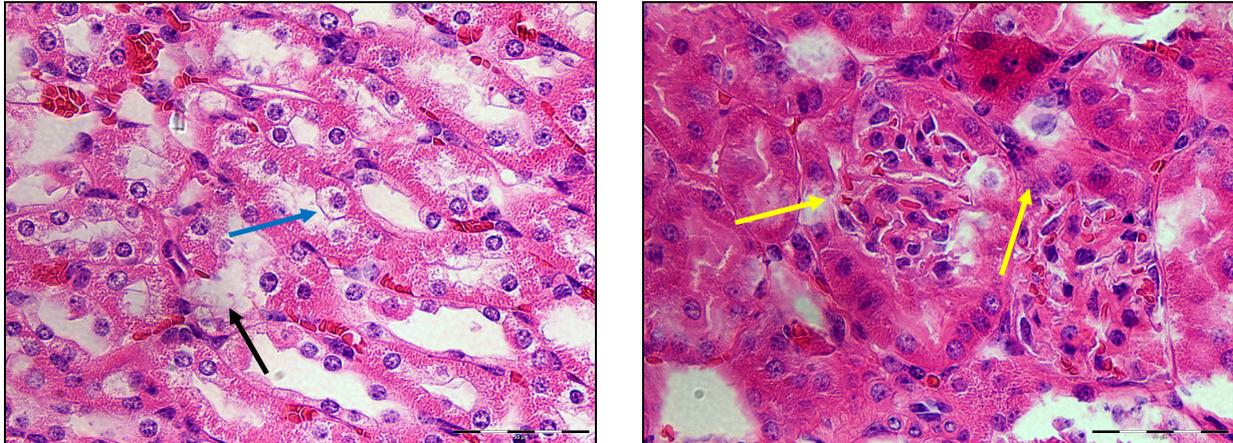
Abbildungen 25 und 26: Einzelne lichtmikroskopische Aufnahmen von Stammzellen nach 5-tägiger Inkubation. Die Zellen haben nun Filopodien (roter Pfeil) und Lobopodien (schwarzer Pfeil) entwickelt (vergrößerte Bildausschnitte).

3.4 Ausmaß der murinen Nierenschädigung nach Ischämie/Reperfusion

Zur lichtmikroskopischen Darstellung einer umfangreicheren Schädigung des murinen Nierengewebes mittels des Ischämie/Reperfusion-Modells ist in einer weiteren Transplantationssitzung die rechte Arteria renalis einer SCID-Maus über 25 Minuten abgeklemmt und nach 30 Minuten entnommen worden. Die linke Niere wird als Kontrollniere ebenfalls aufbewahrt. Es sind Paraffinschnitte (2 μm) dieser beiden Nieren angefertigt und eine Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) vorgenommen worden. Die hypoxisch geschädigte murine Niere zeigt im Gegensatz zur gesunden Mäuseniere ein aufgelockertes Nierenparenchym, die Tubuli sind dilatiert und haben teilweise ihren Zell-Zell-Kontakt untereinander verloren. Die Nierenglomeruli sind unscharf von dem Tubulusgewebe abgrenzbar.



Abbildungen 27 und 28: Lichtmikroskopische Aufnahme der Nierentubuli (linkes Bild) und der Nierenglomeruli (rechtes Bild) der als Kontrolle dienenden linken Mäuseniere nach HE-Färbung (40x). Zu erkennen ist eine gut gegliederte Tubulus- und Glomerulusstruktur. Es sind vereinzelt Einblutungen sowohl im Interstitium als auch in dem Glomerulusgewebe zu erkennen bedingt durch die lange Ischämiephase (25 Minuten) der kontralateralen Niere mit konsekutivem Hochdruck der linken Niere in diese Zeitspanne.



Abbildungen 29 und 30: Lichtmikroskopische Darstellung der hypoxisch geschädigten rechten Mäuseniere nach HE-Färbung (40x). Die Niere ist über einen Zeitraum von 25 Minuten nicht mehr mit Sauerstoff versorgt worden. Linkes Bild: Erkennbar ist eine Aufhebung des geordneten tubulären Zellverbandes, die Dichtigkeit der Zellverbindungen untereinander ist geschädigt worden und die Tubuli sind dilatiert (schwarzer Pfeil). Die Tubuluszellen sind teilweise ödematös geschwollen und vakuolisiert (blauer Pfeil). Es ist druckbedingt zu Einblutungen in das Nierengewebe gekommen. Rechtes Bild: Glomerulus- und Tubulusgewebe sind unscharf voneinander abgrenzbar (gelbe Pfeile). Die Bowmansche Kapsel sowie der Bowmansche Raum sind nicht eindeutig klassifizierbar.

3.5 Fluoreszenzmikroskopische Detektion HLA-positiver Tubulusareale in murinen Nieren

Von den mit humanen CD133-positiven Progenitorzellen transplantierten murinen Nieren sind nach Entnahme Kryostatschnitte mit nachfolgender Fixierung in Aceton angefertigt worden. Diese Schnitte sind einer Fluoreszenzfärbung mit einem gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C gerichteten Antikörper unterzogen worden.

Fluoreszenzmikroskopisch wird im FITC-Kanal nach grün fluoreszierenden Arealen gesucht, die das Vorhandensein humaner CD133-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen im murinen Nierengewebe vermuten lassen. Die Zellkerne sind mittels DAPI gefärbt worden und emittieren nach Exzitation blau. Um zu zeigen, dass die Fluoreszenzfärbung zum Nachweis der humanen Stammzellen funktioniert, werden als Positivkontrolle der Färbung humane A498-Tumorzellen eingesetzt.

Es können Areale in den murinen Nieren ermittelt werden, die ähnlich grün fluoreszieren wie die humanen A498-Tumorzellen. Nachfolgend sind Bilder dieser Areale aufgeführt.

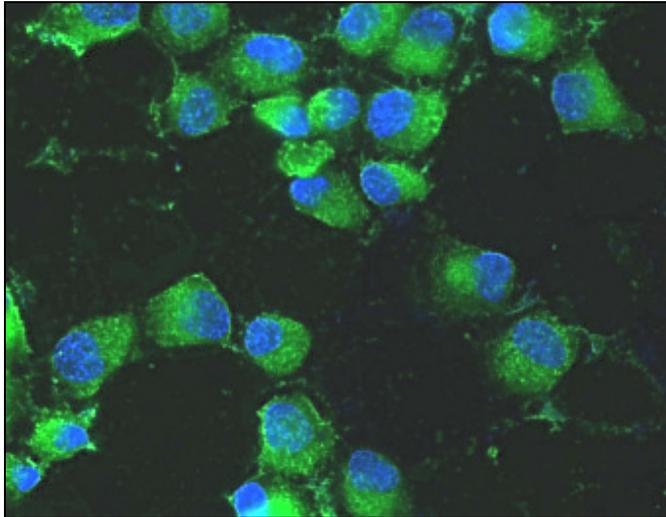


Abbildung 31: Positivkontrolle der HLA-Färbung am Beispiel der humanen Nierentumorzellen A498 (40x). Gefärbt sind die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C (grün) und die Zellkerne mit DAPI (blau).

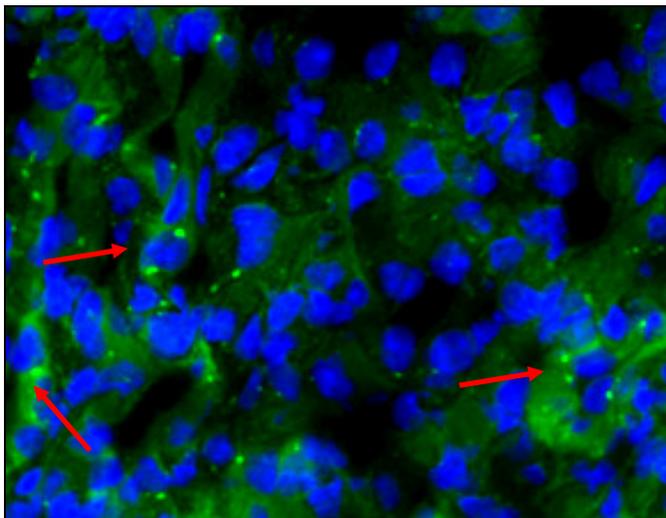


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Integration humaner CD133-positiver Progenitorzellen in murine Nierentubuli (Markierung durch Pfeile) (40x). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden und emittieren blau. Die humanen Zellen sind mittels eines FITC-konjugierten Antikörpers gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C markiert worden und fluoreszieren grün.

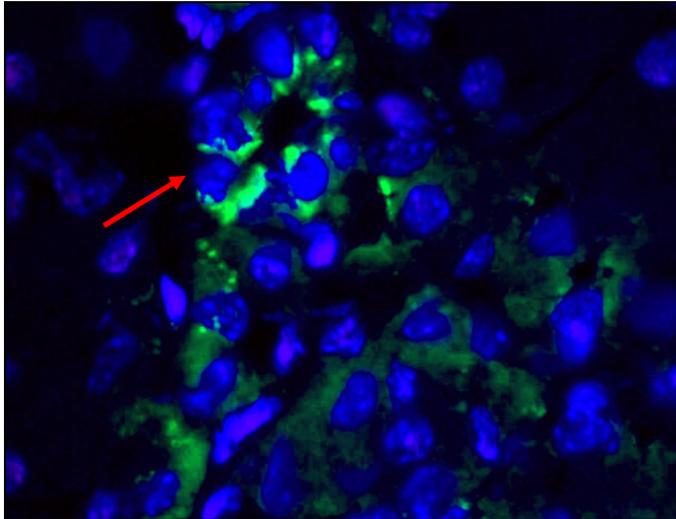
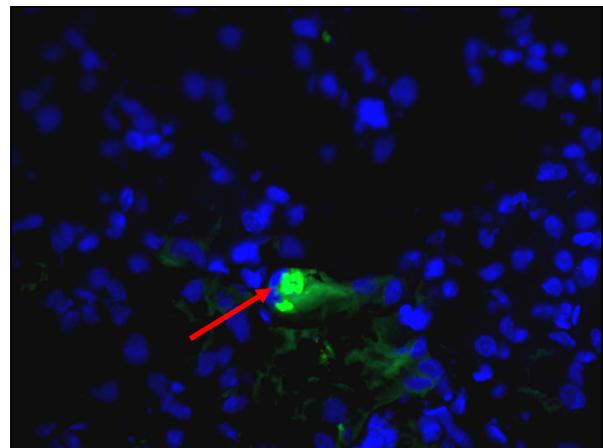
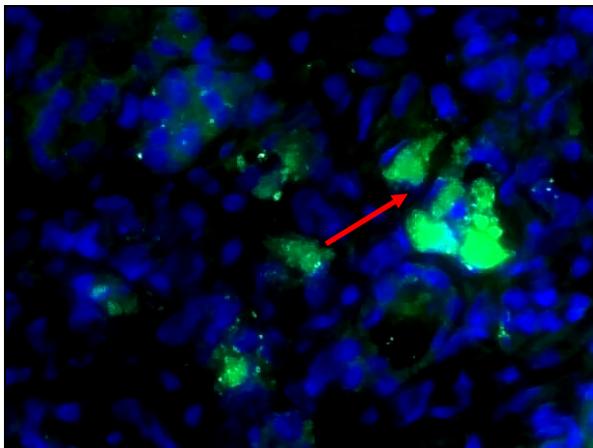


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Integration humaner CD133-positiver Progenitorzellen in murine Nierentubuli (40x). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden und emittieren blau. Die humanen Zellen sind mittels eines FITC-konjugierten Antikörpers gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C markiert worden und fluoreszieren grün. Der Pfeil ist auf einen grün fluoreszierenden murinen Tubulus gerichtet.



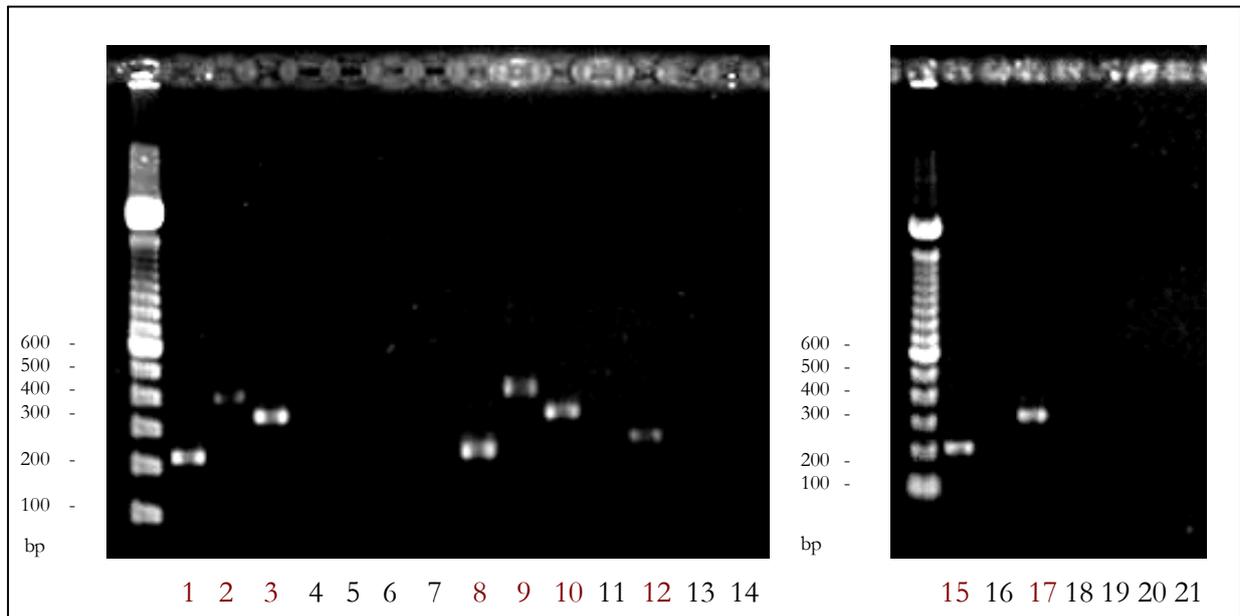
Abbildungen 34 und 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Integration humaner CD133-positiver Progenitorzellen in murine Nierentubuli (Markierung durch Pfeile) (40x). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden und emittieren blau. Die humanen Zellen sind mittels eines FITC-konjugierten Antikörpers gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C markiert worden und fluoreszieren grün.

3.6 Auswertung der Agarose-Gelaufreinigung

Nach der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung sind die beobachteten Stammzellareale mittels laserbasierter Mikrodissektion ausgeschnitten worden und aus diesem Material ist die für eine PCR erforderliche RNA gewonnen worden.

Durch die PCR ist die RNA in DNA umgeschrieben und vervielfältigt sowie in einem anschließendem Gellauf mit Agarose aufgetrennt worden.

In einem UV-Transilluminator (Vilber Lourmat, Marne, Frankreich) können die Banden durch Färbung mit einer Ethidiumbromidlösung sichtbar gemacht werden. Durch Auswertung der Banden kann in der mit CD133-positiven humanen Progenitorzellen transplantierten murinen Niere humanes Material nachgewiesen werden. Sowohl das humane GAPDH, ein wichtiges Enzym des Zellstoffwechsels, als auch humane CD133-positive Progenitorzellen kommen als Bande zum Vorschein. Das humane CD13-Zellepitop als proximaler Tubulusmarker sowie das humane Tamm-Horsfall-Protein als distaler Tubulusmarker sind in der behandelten linken Niere nicht nachweisbar, was darauf schließen lässt, dass eine Differenzierung der humanen CD133-positiven Progenitorzellen in Tubuluszellen noch nicht erfolgt ist. Humanes GAPDH ist auch in der kontralateralen Niere der transplantierten Maus sichtbar. Eventuell hat diese Niere durch die Hochdruckphase während der Dauer der Ischämiephase ebenfalls eine Schädigung erlitten mit konsekutiver "Einwanderung" einiger Stammzellen aus der linken Niere über das Blutgefäßsystem.



bp=Basenpaare

Abbildung 36: Ergebnis der Agarose-Gelaufreinigung. Es wird eine 100-Basenpaar-Leiter verwendet. Bei der mit Stammzellen behandelten rechten Mäuseniere können im Gegensatz zur linken sowie Kontroll-Niere CD133-positive Progenitorzellen nachgewiesen werden (Pfeil). Auch humanes GAPDH - ein wichtiges Enzym des Zellstoffwechsels - kommt bei dieser Niere als Bande zum Vorschein. Humanes GAPDH ist als Bande auch bei der linken Niere der behandelten Maus erkennbar, was bedeutet, dass hier ebenfalls humanes Material vorhanden sein muss, eventuell erklärbar durch *Homing* beziehungsweise über das Blutssystem in die linke Niere gelangte Stammzellen. Die murinen Marker (m-GAPDH, m-96) treten erwartungsgemäß bei allen drei Nieren auf. Die humanen Marker CD13 als proximaler Tubulusmarker und das Tamm-Horsfall-Protein als distaler Tubulusmarker sind bei keiner Niere sichtbar, was darauf hinweist, dass noch keine Differenzierung der humanen CD133-positiven Progenitorzellen in Tubulusepithelzellen stattgefunden hat.

Legende der eingesetzten Primer:

<u>Behandelte Maus</u> <u>linke Niere:</u>	<u>Behandelte Maus</u> <u>rechte (transplantierte) Niere:</u>	<u>Kontrollmaus</u> <u>unbehandelt, gesund:</u>
1: m-GAPDH	8: m-GAPDH	15: m-GAPDH
2: h-GAPDH	9: h-GAPDH	16: h-GAPDH
3: m-96 (Na-K-Co-Transporter)	10: m-96 (Na-K-Co-Transporter)	17: m-96 (Na-K-Co-Transporter)
4: h-CD34	11: h-CD34	18: h-CD34
5: h-CD133	12: h-CD133	19: h-CD133
6: h-TH-Protein	13: h-TH-Protein	20: h-TH-Protein
7: h-CD13	14: h-CD13	21: h-CD13

h= human; m= murin; TH= Tamm Horsfall

3.7 Analyse der FISH-Signale in murinen Nieren durch Fluoreszenzmikroskopie und Laser-Scanning-Zytometrie

Männliche humane Stammzellen werden in weiblichen Mäusenieren anhand ihres Y-Chromosoms fluoreszenzmikroskopisch detektiert. Das Y-Chromosom ist mit einer Sonde im spektralen Grün-Bereich markiert worden. Auf einigen Paraffinschnitten sind die distalen Tubuli in Abgrenzbarkeit zu den proximalen Tubuli mit DBA-Lectin-Rhodamin gefärbt worden.

Bei der Auswertung ist das Y-Chromosom überwiegend am Zellkernrand lokalisierbar. Nachfolgende Bilder erbringen den Nachweis humaner Y-Chromosomen als Beleg für die Eingliederung humaner Zellen in murines Nierengewebe.

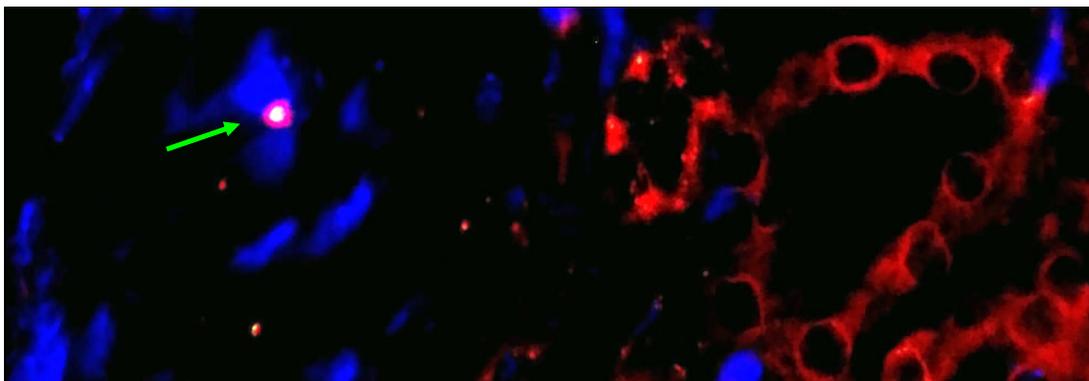


Abbildung 37: Dieses Bild (100x) zeigt die Immunfluoreszenzaufnahme des humanen Y-Chromosoms nach FISH. Der Pfeil ist auf das fluoreszierende Signal des Y-Chromosoms gerichtet (Färbung mit einer Y-FISH-Sonde im grünen Spektralbereich). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden (blaue Signale). Die distalen Tubuli sind zur Abgrenzung gegenüber den proximalen Tubuli mit DBA-Lectin-Rhodamin gefärbt worden. Rechts im Bild ist ein mit DBA-Lectin-Rhodamin gefärbter, rot fluoreszierender distaler Tubulus zu sehen. Das Y-Chromosom wird in einem proximalen Tubulus lokalisiert, da dieser Bereich keine Fluoreszenz im Rot-Bereich aufweist.

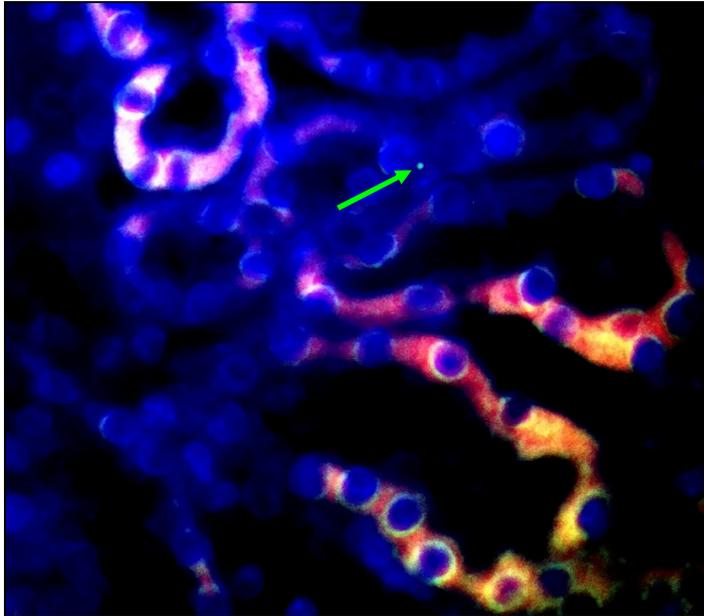


Abbildung 38: Dieses Bild (40x) zeigt die Immunfluoreszenzaufnahme des humanen Y-Chromosoms nach FISH. Der Pfeil ist auf das fluoreszierende Signal des Y-Chromosoms gerichtet (Färbung mit einer Y-FISH-Sonde im grünen Spektralbereich). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden (blaue Signale). Die distalen Tubuli sind zur Abgrenzung gegenüber den proximalen Tubuli mit DBA-Lectin-Rhodamin gefärbt worden. Links im Bild ist ein mit DBA-Lectin-Rhodamin gefärbter, rot fluoreszierender distaler Tubulus zu sehen. Das Y-Chromosom wird in einem proximalen Tubulus lokalisiert, da dieser Teil des Bildes keine Fluoreszenz im Rot-Bereich aufweist.

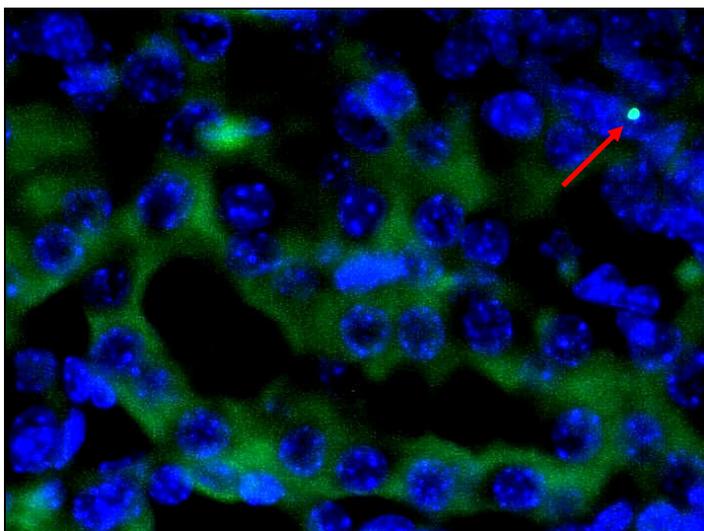


Abbildung 39: Positives FISH-Signal (Pfeil) des humanen männlichen Y-Chromosoms in einer weiblichen murinen Niere (40x). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden und fluoreszieren blau. Für die Markierung des männlichen Y-Chromosoms wird eine Y-FISH-Sonde im grünen Spektralbereich eingesetzt.

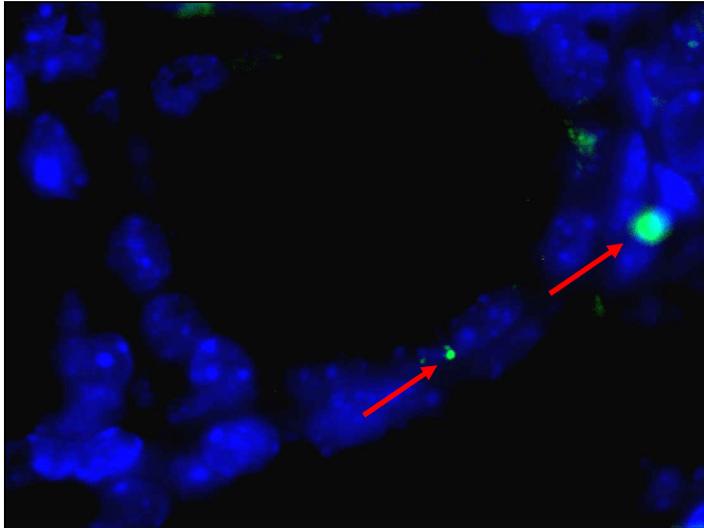


Abbildung 40: Positive FISH-Signale (Pfeile) des humanen männlichen Y-Chromosoms in einer weiblichen murinen Niere (100x). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden und fluoreszieren blau. Für die Markierung des männlichen Y-Chromosoms wird eine Y-FISH-Sonde im grünen Spektralbereich eingesetzt.

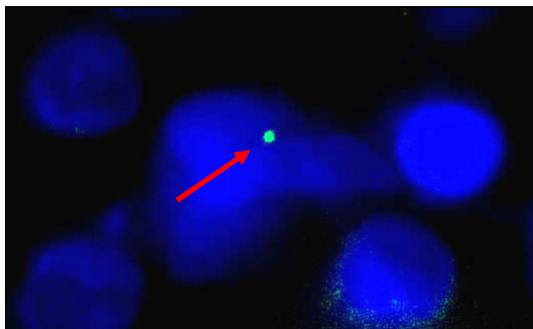


Abbildung 41: Positives FISH-Signal (Pfeil) des humanen männlichen Y-Chromosoms in einer weiblichen murinen Niere (vergrößerter Bildausschnitt). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt worden und fluoreszieren blau. Für die Markierung des männlichen Y-Chromosoms wird eine Y-FISH-Sonde im grünen Spektralbereich eingesetzt.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei allen untersuchten murinen Nieren, die mit Stammzellen behandelt worden sind, kann - nach Auswertung der Immunfluoreszenz - die Integration von vereinzelt humanen CD133-positiven Progenitorzellen in die Tubuli nachgewiesen werden (<1%). Eine Integration in Glomeruli oder andere Nierenregionen wird hingegen nicht beobachtet.

4 Diskussion

4.1 Forschung mit Stammzellen

Vielversprechende Ergebnisse in den noch jungen Jahren der Stammzellforschung erwecken zunehmend das Interesse der Öffentlichkeit. Erkrankungen, die bisher als unheilbar beziehungsweise schwer therapierbar gelten, könnten wohlmöglich schon in naher Zukunft durch den Einsatz von Stammzellen positiv in ihrem Verlauf beeinflusst werden. Dieses Ziel vor Augen, werden bereits nahezu alle Organe des menschlichen Körpers und deren Erkrankungen in den Fokus der Forschung miteinbezogen.

Weltweit existierten bereits 2002 über 350 Unternehmen mit der Ausrichtung auf Stammzellforschung, darunter befanden sich damals bereits 80 an der Börse (Döhmen und Reis 2002).

Im Jahr 1998 ist es *James A. Thomson* und seinem Team in Wisconsin, USA, erstmals erfolgreich gelungen, humane embryonale Stammzellen durch spezielle Techniken unter Bewahrung ihres Phäno- und Genotyps *in vitro* zu vermehren. Gewonnen wurden die Zellen aus der inneren Zellmasse humaner Blastozysten durch *in vitro*-Fertilisation (Thomson et al. 1998).

Religiöse und ethische Aspekte dürfen bei der Verwendung embryonaler Stammzellen jedoch nicht vernachlässigt werden. Letztere müssen aus überzähligen Embryonen einer künstlichen Befruchtung, abortierten Feten oder auch durch Klonen zur Verfügung gestellt werden. Dabei wird ein potenziell lebensfähiger Organismus zerstört. Für die Herstellung einer einzigen embryonalen Stammzelllinie müssen 30 und mehr Embryonen geopfert werden. In Deutschland ist im Gegensatz zu anderen Staaten durch die Einführung des Embryonenschutzgesetzes im Jahre 1990 die Verwendung von Embryonen für Forschungszwecke verboten worden; es darf lediglich von Vorkernstadien (Pronukleusstadien) Gebrauch gemacht werden.

Was macht embryonale Stammzellen bei Forschern so beliebt? Hierbei scheint die Tatsache ihrer Pluripotenz eine wichtige Rolle zu spielen: Embryonale Stammzellen können sich noch zu allen aus den drei Keimblättern hervorgehenden Gewebearten des menschlichen Körpers differenzieren. Der Nachweis ihrer Pluripotenz ist durch verschiedene Experimente erfolgt; ein entscheidendes Argument ist dabei die Entstehung von Teratomen aus embryonalen Stammzellen (Smith 2001; Martin 1981). Es handelt sich um benigne Keimzelltumoren mit Material aus allen drei Keimblättern.

Umgekehrt wurden pluripotente Stammzellen erstmals in Teratocarcinomen entdeckt (Donovan und Gearhart 2001).

Forscher haben lange Zeit (bis circa Ende 2001) angenommen, dass embryonale Stammzellen allein diese bemerkenswerte Fähigkeit der Pluripotenz besitzen. Ein Forschungsteam um *Yuehua Jiang*, Minnesota USA, veröffentlichte 2002 Ergebnisse über die Arbeit mit adulten Knochenmarkstammzellen in Tierversuchen. Jiang stellte fest, dass sich auch diese Stammzellart über lange Zeit unbegrenzt vermehren könne, ohne dass sich ihre Telomere verkürzten. Adulte Knochenmarkstammzellen hätten ebenso das Potenzial, sich zu fast allen Gewebearten des Körpers zu entwickeln (Jiang et al. 2002a).

Adulte Stammzellen wurden unter anderem in Geweben wie dem Knochenmark (Jiang et al. 2002b; Gronthos et al. 2003; Spangrude et al. 1988), dem Gehirn (Gage 2000), dem peripheren Nervensystem (Kruger und Morrison 2002; Kruger et al. 2002), dem Herzen (Beltrami et al. 2003), den Skelettmuskeln (Jiang et al. 2002b) und der Haut (Toma et al. 2001) nachgewiesen.

Am Besten untersucht unter den adulten Stammzellen sind hämatopoetische Stammzellen. Blutstammzellen können durch Aspiration aus dem Knochenmark nach vorangegangener Stimulation mittels des Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (G-CSF), durch Leukapherese aus dem peripheren Venenblut oder unmittelbar nach der Geburt durch Punktion aus dem Nabelschnurvenenblut gewonnen werden.

Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts wurde zum ersten Mal die Hypothese der Existenz von multipotenten hämatopoetischen Stammzellen durch *Alexander Maximow* und *Artur Pappenheim* aufgestellt (Mertelsmann 2000; Sankiewicz 1998).

James E. Till und *Ernest A. McCulloch* lieferten im Jahr 1961 den Beweis der Existenz adulter hämatopoetischer Stammzellen im Mausmodell. Sie transplantierten murines Knochenmark in mit einer normalerweise letalen Dosis bestrahlte Mäuse. Es kam zur vollständigen Rekonstitution des gesamten Blutsystems (Till und McCulloch 1961).

Die Knochenmarktransplantation hat sich unter ihrem Pionier *Edward D. Thomas* erfolgreich im Klinikalltag etabliert (Tögel et al. 2007). Thomas erhielt für seine Arbeiten im Jahre 1990 den Nobelpreis für Medizin. Er führte die erste erfolgreiche Knochenmarktransplantation an einem eineiigen Zwillingpaar in Cooperstown, New York, in den späten fünfziger Jahren durch. Ein Zwilling war an Leukämie erkrankt.

Forschungsergebnisse zeigen, dass aus adulten Knochenmarkstammzellen außer Zellen des Blutbildungssystems auch andere Zelltypen hervorgehen (Beltrami et al. 2007; Levicar et al. 2007;

Abkowitz 2002; Jackson et al. 2001; Krause et al. 2001). Diese *Wandlungsfähigkeit* der Zellen wird als "Plastizität" bezeichnet und legt die Vermutung einer Pluripotenz dieser Zellen nahe.

Arbeiten zeigen den Besitz adulten Knochenmarks an Stammzellen, die unter anderem durch ihre Expression von Oct-4 und Nanog Ähnlichkeiten mit embryonalen Stammzellen aufweisen (Kucia et al. 2007; Ratajczak et al. 2007). Bei Oct-4 und Nanog handelt es sich um typische embryonale Marker.

Die jüngste Quelle adulter hämatologischer Stammzellen ist Nabelschnurblut. Erstmals transplantierte *Eliane Gluckman* diese Zellen 1988 in Paris einem Jungen, der an einer Fanconi-Anämie erkrankt war (Gluckman et al. 1989).

Es sind bisher über 5500 allogene Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurblut durchgeführt worden (Lubin und Shearer 2007). Durch die Einrichtung öffentlicher Nabelschnurblutbanken wird die Kryokonservierung von Nabelschnurblutmaterial ermöglicht. Der große Vorteil der Nabelschnurbluttransplantation ist das geringere Risiko einer Reaktion von Spenderzellen gegen Empfängerewebe, *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) (Bornstein et al. 2005), einer der Hauptursachen für die hohe transplantationsassoziierte Morbidität und Mortalität, insbesondere bei allogenen Stammzellspendern. Hämatopoetische Stammzellen der Nabelschnur sind immunologisch nativ und noch nicht geprägt.

Arbeiten von Forschern können zeigen, dass Stammzelltransplantationen aus Nabelschnurblut bei unverwandten Stammzellspendern eine gute Verträglichkeit aufweisen und durchaus eine Alternative zur Knochenmarktransplantation darstellen (Rubinstein et al. 1998; Kurtzberg et al. 1996; Wagner et al. 1996).

Verglichen mit hämatopoetischen Stammzellen von Erwachsenen zeichnen sich hämatopoetische Stammzellen der Nabelschnur durch gewisse Vorteile in ihrer Proliferationskapazität, wie längere Telomere und eine höhere Zellzyklusrate, aus (Gluckman et al. 1997).

In Mausmodellen kann unter anderem eine regenerative Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnurblut an Lebererkrankungen (Kakinuma et al. 2007; Di Campli et al. 2004) und ischämischem Muskelgewebe (Pesce et al. 2003) gezeigt werden. In vitro lassen sich aus hämatopoetischen Progenitorzellen der Nabelschnur Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten generieren (Buzanska et al. 2006).

Eine innovative Entdeckung machten Göttinger Forscher im Jahr 2007: Sie beschrieben zum ersten Mal spermatogoniale Stammzellen. In Mausmodellen wird diesen Zellen Pluripotenz zugeschrieben,

da sie sich in Zelltypen mit Ursprung aus allen drei Keimblättern differenzieren und damit Ähnlichkeiten mit embryonalen Stammzellen aufweisen (Guan K et al. 2007; Nayernia 2007; Guan K et al. 2006). Im Jahr 2008 feierten Forscher aus Tübingen eine Premiere in der Stammzellforschung, sie konnten spermatogoniale Stammzellen aus *humanem* Hodengewebe generieren.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass spermatogoniale Stammzellen zukünftig hoffnungsvolle Chancen bei der Therapie verschiedener Organerkrankungen bieten und bei bisher als unfruchtbar geltenden Männern einen Kinderwunsch erfüllen könnten. Aus ethischer Sichtweise ist ihre Verwendung unbedenklicher als die embryonaler Stammzellen (Guan K et al. 2006). Auch das weibliche Pendant, die Oozyte, steht derzeit in der Diskussion, ebenfalls pluripotente Zellen hervorbringen zu können (Telfer und McLaughlin 2007).

4.2 Bisherige Arbeiten über die Anwendung hämatopoetischer Stammzellen bezüglich der Nierenregeneration nach Ischämie - eine kritische Betrachtung

Im Folgenden sollen bereits publizierte Ergebnisse im Kontext der Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen an der Nierenregeneration nach Anwendung des Ischämie/Reperfusion-Modells verglichen werden.

Bisher gibt es keine veröffentlichten Daten über die Verwendung hämatopoetischer Progenitorzellen - insbesondere CD133-positiver Progenitorzellen - aus humanem Nabelschnurblut im Xenotransplantationsmodell Mensch-Maus.

Es gibt Forschungsgruppen, die von *keiner* Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen an der Nierenregeneration ausgehen, da sie in ihren Arbeiten diesen Nachweis nicht erbringen konnten, sei es durch Mängel in der technischen Ausführung und Auswertung (zum Beispiel setzten Duffield (Duffield et al. 2005) und Stokman (Stokman et al. 2005) lediglich nur ein einziges Verfahren, nämlich die FISH-Methode, zur Ergebnisfindung ein) oder einfach durch ein "falsches Konzept".

Es existieren wiederum Forschungsteams, die durch ihre Arbeiten *eine* Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen an der Nierenregeneration belegen können.

Die vorliegende Arbeit hat gegenüber anderen den Vorteil, dass sie die Beteiligung humaner CD133-positiver Progenitorzellen an der Nierenregeneration durch den Einsatz multipler Verfahren zeigt. So kommen neben den auf Fluoreszenz-basierenden Verfahren wie der Färbung der humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C, der FACS und der Methode der FISH, auch die PCR und als neuere Methode die Laser-Scanning-Zytometrie zum Einsatz. Somit können Fehler in der Ergebnisfindung und -auswertung deutlich reduziert werden.

Es werden sowohl Untersuchungen auf zellulärer Ebene durch Nachweis humaner Marker auf der Zellmembran als auch auf subzellulärer Ebene via Erbinformation (DNA) und Proteinsynthesemechanismen möglich.

Als erstes seien Arbeiten erwähnt, die nicht von einer Beteiligung hämatopoetischer Stammzellen an der Nierenregeneration ausgehen.

Geurt Stokman stellte im Jahr 2005 die Hypothese auf, dass die Erholung hypoxisch geschädigten Nierengewebes eher unabhängig von der Integration hämatopoetischer Stammzellen sei.

Im Mausmodell konnten er und sein Team unter anderem durch die Methode der FISH die Beobachtung treffen, dass hämatopoetische Stammzellen des Knochenmarks männlicher Mäuse, die das verstärkt grün fluoreszierende Protein (enhanced green fluorescent protein, eGFP) exprimierten, nicht für die Regeneration der Nierentubuluszellen weiblicher Mäuse verantwortlich sind. Die weiblichen Mäuse waren zuvor mit einer letalen Dosis bestrahlt worden. Vielmehr sei die Verbesserung der Nierenfunktion durch immunmodulatorische Aspekte bedingt. Die Mäuse erhielten den Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) und den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF) fünf Tage bevor ein beidseitiger hypoxischer Nierenschaden gesetzt wurde.

Die Zytokine SCF und G-CSF bewirken eine Abnahme der Einwanderung von Granulozyten in das Nierengewebe, was zu einer Reduktion des posthypoxischen Entzündungsgeschehens in der Niere führt (Stokman et al. 2005).

Im selben Jahr konnte *Jeremy S. Duffield* ähnliche Ergebnisse im Mausmodell nach Anwendung des Ischämie/Reperfusion-Modells aufzeigen. Zum Einsatz kamen chimäre Mäuse, die entweder GFP- oder bakterielles β -gal-exprimierende mesenchymale Spender-Knochenmarkstammzellen (mesenchymal stem cells, MSC) erhielten, oder auch weibliche Mäuse, denen Knochenmark-

stammzellen männlicher Mäuse transplantiert wurden und deren "Spenderstammzellen" somit über das Y-Chromosom dargestellt werden konnten (Duffield et al. 2005).

In GFP-chimären Mäusen exprimierten lediglich einige interstitielle, jedoch keine tubuläre Zellen GFP nach einem hypoxischen Nierenschaden. Bei mehr als 99% der GFP-positiven interstitiellen Zellen handelte es sich um Leukozyten.

In weiblichen Mäusen mit männlichen Knochenmarkstammzellen konnten nur 0,06% der Tubuluszellen gefunden werden, die positiv für das Y-Chromosom waren. Dieser Befund stellte sich nach Dekonvolutions-Mikroskopie partiell als Artefakt heraus.

In β -gal-chimären Mäusen schienen einige tubuläre Zellen zwar β -gal zu exprimieren, doch nach Unterdrückung der endogenen β -gal-Synthese (Weiss et al. 1999) waren keine Tubuluszellen mehr positiv für exogen zugeführtes β -gal.

Obwohl keine Knochenmarkstammzellen in Tubuluszellen nachgewiesen werden konnten, zeigten viele Tubuluszellen das proliferierende Zellkern-Antigen (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), welches auf eine hohe Zellproliferationsrate hinweist.

Das Ergebnis der Arbeit Duffields lässt demnach eher eine Beteiligung überlebender niereneigener Tubuluszellen an der Regeneration einer hypoxisch geschädigten Niere vermuten (Duffield et al. 2005).

Benjamin Dekel arbeitete bereits mit einem Xenotransplantationsmodell Mensch-Maus. Im Jahr 2006 veröffentlichte er seine Ergebnisse: Adulte humane CD34-positive Progenitorzellen, gewonnen aus dem peripheren Blut nach Stimulation durch G-CSF, wurden nach hypoxischer Nierenschädigung direkt in das Parenchym der Mäusenieren transplantiert.

In einem weiteren Versuch wurden humane CD34-positive Progenitorzellen zusammen mit embryonalem Nierengewebe von Schweinen unter die murine Nierenkapsel transplantiert. Hierdurch sollte die Beteiligung CD34-positiver Stammzellen an der Organentwicklung überprüft werden. Die Auswertung erfolgte mittels Immunhistochemie mit humanspezifischen Antikörpern und einer real-time-PCR.

Zwar kam es bei erst genannter Methode zu einer diffusen Verteilung der transplantierten Zellen in den murinen Nieren, jedoch führten die Forscher diese Tatsache auf erhöhte Mengen des Hypoxie-induzierenden Faktors-1 (Hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) und des Stromazellfaktors-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1) - bedingt durch Ischämie - zurück. HIF-1 und SDF-1 bewirken eine verstärkte Migration von (CD34⁺-) Progenitorzellen (Ceradini et al. 2004; Kollet et al. 2003). Im Interstitium wurden CD45-positive hämatopoetische Zellen gefunden. Einige weitere Zellen waren

positiv für CD31, einem endothelialen Marker, welcher laut Autoren auf eine Beteiligung dieser Zellen an der Neovaskularisation der Niere hindeute.

Im zweiten Modell wurden CD31- und CD34-positive Zellen lediglich in der Peripherie des Schweine-Transplantat-Nierengewebes gefunden.

In beiden Versuchsmodellen kamen Dekel und sein Team zu dem Ergebnis, dass humane CD34-positive Progenitorzellen weder am Nierenwachstum/-entwicklung, noch an der Nierenregeneration beteiligt seien (Dekel et al. 2006).

Es existieren ebenso Veröffentlichungen mit Ergebnissen, die für eine Beteiligung humaner hämatopoetischer Stammzellen an der posthypoxischen Nierenregeneration sprechen.

Fangming Lin beschrieb im Jahr 2003 erste Ergebnisse über die Partizipation hämatopoetischer Stammzellen an der Nierenregeneration. Knochenmarkstammzellen wurden von Femura und Tibiae männlicher β -Galaktosidase-exprimierender Rosa26-Mäuse gewonnen und via FACS aufgereinigt. Zielgruppe waren $Rh^{10}Lin^{-}Sca-1^{+}ckit^{+}$ -Zellen. Diese Zellen wurden weiblichen Mäusen nach unilateral zugeführtem Ischämie/Reperfusionsschaden in die Schwanzvene transplantiert. Per Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung konnte das männliche Y-Chromosom in circa 8% der Tubuluszellen der weiblichen Mäuse detektiert werden. Durch eine PCR wurde das spezifisch männliche Sry-Gen lokalisiert. β -Galaktosidase-positive Zellen konnten in proximalen Tubuluszellen der Empfängermäuse gesehen werden. Interessanterweise waren 80% der proximalen Tubuluszellen, die positiv für β -Galactosidase waren, auch positiv für Na/Pi-2 oder Fx1A, beides sind proximale Tubulusmarker. Außerdem verloren diese transplantierten Zellen den Leukozytenmarker CD45.2. Die Arbeit von Lin und ihrem Team zeigt, dass hämatopoetische Stammzellen in Tubuluszellen differenzieren und somit für die Therapie des akuten Nierenversagens von Bedeutung sein können (Lin et al. 2003).

Auch die Forschungsgruppe um *Sujata Kale* konnte im gleichen Jahr ähnlich positive Ergebnisse aufzeigen. Rosa26-Mäuse, die das bakterielle lacZ-Gen enthielten, dienten als Spender von Knochenmarkstammzellen. Gewonnen wurden die Knochenmarkstammzellen aus Femura und Tibiae dieser Mäuse.

Subletal bestrahlte Empfängermäuse erhielten intravenös mittels der FACS-Methode selektierte $Lin^{-}Sca-1^{+}c-kit^{+}$ -Knochenmarkstammzellen der Rosa26-Mäuse. Diese Stammzellen wurden über ihre

β -Galactosidase-Expression detektiert. Es wurde ein unselektiver Nierenschaden durch das Ischämie/Reperfusionen-Modell erzeugt. Ungefähr 20% der Tubuli im äußeren Markbereich der ischämischen Nieren enthielten β -Galaktosidase-positive Zellen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass Knochenmarkstammzellen ein großer Anteil an der Repopulation ischämischer Tubuluszellen zukommt und erstere somit Potenzial für die Heilung des akuten Nierenversagens tragen. Kale berichtete über ein weiteres positives Argument für die Transplantation von Stammzellen: Knochenmarkstammzellen reduzieren offensichtlich den Harnstoff-Stickstoffgehalt im Blut nach renaler Ischämie (Kale et al. 2003).

Martine Broekema deklarierte 2005 in einem Xenotransplantationsmodell Mensch-Ratte, dass der Umfang der tubulären Integration von Knochenmarkstammzellen abhängig von dem renalen Schädigungsgrad, verbunden mit der Zeitspanne des erzeugten Ischämie/Reperfusionen-Schadens, sei. F344-Ratten wurden mit R26-humanen transgenen (plazentare Alkalinphosphatase-exprimierenden) Knochenmarkstammzellen nach einseitiger hypoxischer Nierenschädigung behandelt. Die Eingliederung der Knochenmarkstammzellen in das Tubulusepithel der Ratten war dabei umso größer, je länger die Ischämiezeit anhielt (Broekema et al. 2005).

4.3 Einordnung dieser Dissertation in den Kontext der kurativen Anwendung hämatopoetischer Stammzellen nach Schädigung der Niere durch das Ischämie/Reperfusionen-Modell

In der vorliegenden Arbeit werden humane hämatopoetische Stammzellen nicht aus dem Knochenmark, sondern aus vollem Nabelschnurblut postpartal gewonnen. Durch die Methode der Magnet-aktivierten Zellsortierung (MACS) wird die Lymphozytenpopulation auf CD133-positive Progenitorzellen selektiert. Diese CD133-positiven Zellen werden SCID-Mäusen direkt unter die Nierenkapsel nach ischämischer Schädigung der Niere durch Abklemmung der Arteria renalis transplantiert. Durch die Methoden der Immunhistochemie mit anschließender Fluoreszenzmikroskopie, der PCR und der FISH kann eine Integration der transplantierten Zellen in das murine Tubulusepithel gezeigt werden. CD133-positive Progenitorzellen sind phylogenetisch betrachtet noch auf einer primitiven Entwicklungsstufe und scheinen ein hohes Potenzial zu besitzen, geschädigtes Nierengewebe zu regenerieren. Diese Arbeit kann erstmalig anhand eines Xenotransplantations-

modells Mensch-Maus den Nachweis der Integration exogener CD133-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen in Tubuli hypoxisch geschädigter Nieren erbringen.

4.4 Intrarenale Stammzellen als Quelle endogener Nierenregeneration

Es existieren Ergebnisse einzelner Arbeiten, die eine niereneigene Regenerationskapazität durch endogene adulte Stammzellen in der Niere vermuten lassen:

Benedetta Bussolati beschäftigt sich ebenfalls mit Zellen des Phänotyps CD133 im Kontext der Nierenregeneration, allerdings beschreibt sie mit diesem Antigen adulte humane Progenitorzellen der Niere.

In ihrer Arbeit von 2005 erfolgte die Isolierung der CD133-positiven Progenitorzellen aus der menschlichen Niere durch Magnet-aktivierte Zellsortierung. Diese Zellen exprimierten zusätzlich den embryonalen Nierenmarker PAX-2. Wurden die CD133-positiven Progenitorzellen subcutan in den linken Flankenbereich von SCID-Mäuse implantiert, formten sie tubuläre Strukturen, die renale epitheliale Marker, wie beispielsweise die Aminopeptidase A oder den NaCl-Cotransporter, exprimierten. Es kam weiterhin zur Bildung von Blutgefäßen, wenn sich die Progenitorzellen in Endothelzellen differenzierten.

Wurden die CD133-positiven Progenitorzellen SCID-Mäusen mit Glycerol-induzierter Tubulonekrose intravenös verabreicht, wanderten die Zellen in die geschädigte Niere und integrierten sich in das Tubulusgewebe. Bussolati und ihre Forschungsgruppe stellten die Vermutung auf, dass es sich bei den CD133-positiven Progenitorzellen der Niere um multipotente adulte Stammzellen handelt, die imstande sind, geschädigtes Nierengewebe zu regenerieren (Bussolati et al. 2005).

Auch *Juan A. Oliver* postulierte 2004 in der Niere ein Reservoir von langsam-proliferierenden endogenen adulten Stammzellen, und zwar mit Sitz in der Nierenpapille. Nachgewiesen wurden diese Zellen mittels des Nukleotids 5'-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU). Nach transientscher Ischämie im Maus- und Ratten-Modell traten die Zellen in den Zellzyklus ein und waren in der Nierenpapille nicht mehr sichtbar, vermutlich aufgrund ihrer Beteiligung an der renalen Regeneration.

In vitro konnte das Team um Oliver eine Pluripotenz dieser residenten Stammzellen durch Nachweis der Plastizität der Zellen zeigen. Beispielsweise konnte auf manchen dieser Zellen unter bestimmten

Kulturbedingungen die Expression neuronaler Marker wie Nestin und Klasse-III- β -Tubulin gezeigt werden (Oliver et al. 2004).

Die Forschungsgruppe um *Akito Maeshima* wies ebenfalls im Rattenmodell in der Niere langsam-proliferierende Tubuluszellen, sogenannte *label-retainig tubular cells* (LRTC) durch Färbung mit BrdU nach. Nach ischämischer Schädigung traten diese Zellen in den Zellzyklus ein, und die meisten unter ihnen waren positiv für PCNA. Im Gegensatz dazu konnten nur einige wenige tubuläre Zellen beobachtet werden, die positiv für dieses Antigen, jedoch negativ für BrdU waren. Dementsprechend scheinen proliferierende Zellen während tubulärer Regeneration überwiegend von den LRTC-Zellen zu stammen. Zudem konnte auf Abkömmlingen dieser Zellen der mesenchymale Marker Vimentin in der frühen Phase der Regeneration und in der späten Phase E-Cadherin gezeigt werden. E-Cadherin ist ein zellulärer Adhäsionsmarker, der für den Zell-Zell-Kontakt und damit für die Gewebestabilität wichtig ist (König et al. 2006, Blaschke et al. 2002).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung einer Beteiligung der LRTC-Zellen an der Regeneration geschädigter Tubuluszellen als *Progenitor-ähnliche* Tubuluszellen nahe.

Auch *in vitro* konnte das Forschungsteam feststellen, dass LRTC-Zellen tubuläre Strukturen annehmen (Maeshima et al. 2003).

Die schon erwähnte Arbeit von *Jeremy S. Duffield* sowie eine weitere Publikation von *Fangming Lin* aus dem Jahre 2006 lassen im Mausmodell auf eine Hauptbeteiligung *intrarenal* lokalisierter Zellen an der Nierenrekonvaleszenz schließen (Duffield et al. 2005; Lin 2006).

Die vorliegende Dissertation zeigt durch eine Immunfluoreszenzfärbung mittels eines Antikörpers gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C eine Eingliederung der humanen CD133-positiven Progenitorzellen - gewonnen aus Nabelschnurvollblut - in das murine Tubulusepithel. Durch eine FISH-Analyse wird das humane männliche Y-Chromosom in weiblichen Mäusenieren detektiert. Die Ergebnisse dieser beiden Verfahren weisen auf eine Partizipation von Zellen *extarenalen* Ursprungs an der Nierenregeneration hin, denn sowohl durch die Verwendung eines humanspezifischen Antikörpers als auch durch Lokalisation des spezifisch männlichen Y-Chromosoms in weiblichen Empfängertieren kann sichergestellt werden, dass es sich bei den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Tubuluszellen nicht um Zellen muriner Abstammung handelt.

4.5 Ischämie/Reperfusions-Modell versus andere Schädigungsverfahren der Niere

4.5.1 Ischämie/Reperfusions-Modell

Das zu Grunde liegende renale Schädigungsmuster basiert in dieser Dissertation auf dem Ischämie/Reperfusions-Modell: Es wird ein unilateraler Nierenschaden in SCID-Mäusen erzeugt, und zwar durch Unterbindung des Blutflusses der rechten Arteria renalis mittels einer Arterienklemme über mehrere Minuten.

Durch das Ischämie/Reperfusions-Verfahren wird ein *unselektiver* renaler Schaden hervorgerufen; die Niere in ihrer Gesamtheit ist von dieser Schädigung betroffen.

Abhängig von der Ischämiedauer kommt es zu unterschiedlich stark ausgeprägten Funktionseinbußen aufgrund eines kontinuierlichen ATP-Abfalles in den renalen Parenchymzellen mit konsekutiver apoptotischer oder auch nekrotischer Schädigung. Lactat häuft sich aufgrund eines während der Ischämiephase, bedingt durch den ATP-Mangel, anaerob ablaufenden Stoffwechsels, in den Zellen als Abfallprodukt an; eine renale Azidose ist die Folge.

Eine Forschungsgruppe um *Craig Brooks* geht von einem positiven Effekt des pH-Wert-Abfalls während Ischämie bezüglich apoptotischer Vorgänge durch Hemmung der Caspase 9 - eines Enzyms in Apoptosomen - aus (Brooks et al. 2005).

Tubuluszellen reagieren aufgrund ihres Stoffwechsels sehr sensibel auf ischämische Reize, allerdings verfügt die Niere wegen ihrer guten Erholungskapazität auch über eine bemerkenswerte Toleranz gegenüber Ischämie (Thorn 1971).

Es kann durch Untersuchungen an Mensch und Tier gezeigt werden, dass Ischämiezeiten von mehr als 30 Minuten zu nekrotischen Arealen im Tubulussystem, insbesondere in den proximalen Tubuli contorti, führen. Ischämiezeiten von 120-180 Minuten rufen eine Totalnekrose des Tubulugewebes bei Intaktheit von Glomeruli und Sammelrohren hervor (Pfeiffer 2005).

Eine Erholung des Tubulusapparates ist bei reversibler Schädigung innerhalb weniger Wochen möglich. Der Umfang der tubulären Schädigung ist proportional zur Ischämiedauer.

Allerdings ist die Vulnerabilität der Tubuluszellen nicht einheitlich: Unversehrte, reversibel und irreversibel geschädigte Zellen kommen nebeneinander vor (Bayne et al. 1994).

Es gibt verschiedene Möglichkeiten des Schweregrades, um einen ischämischen Schaden der Niere hervorzurufen. Milde bis mäßige Hypoxie bei partieller Ischämie ist durch Abklemmung der suprarenalen Aorta möglich. Hierbei ist eine Blutversorgung des Nierenparenchyms noch durch Kollateralkreisläufe über Kapsel-, Nebennieren- und uretrale Arterien sowie eine Restperfusion der Arteria renalis über eine retrograd durchströmte Aorta möglich (Pfeiffer 2005).

Eine partielle, schwere Ischämie der Niere mit subtotaler Hypoxie kann durch eine supra- und infrarenale Abklemmung und/oder Abklemmung der Nierenarterien bewirkt werden. In diesem Fall ist eine renale Blutversorgung nur noch über Kollateralflüsse gegeben (Pfeiffer 2005).

Eine vollkommene Ischämie bei totaler Hypoxie ist durch Abklemmung der Arteria renalis, der aus ihr entspringenden Nebennierenarterie(n) und eine vollständige Dissektion der Niere aus ihrer Fettgewebekapsel möglich (Pfeiffer 2005).

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Dissertation ist die Variante der vollständigen Ischämie bevorzugt worden, da es sich hierbei um eine weitgehend standardisierte Methode handelt, bei der keine Spezies-abhängigen oder individuell bedingten Variabilitäten der renalen "Alternativ-Versorgungskapazitäten" durch Kollateralflüsse und/oder Restperfusion bestehen.

Der Blutfluss der Niere unterliegt unter physiologischen Bedingungen einer Autoregulation bei einem mittleren Blutdruck zwischen 80 und 180 mmHg.

Durch autoradiografische Messungen kann gezeigt werden, dass mehr als 90% des renalen Blutflusses der Nutrition der Nierenrinde dienen; der vom Cortex ausgehende medulläre Blutfluss ist deutlich geringer (Pfeiffer 2005). Die restlichen 10% dienen der Blutversorgung von Nieren- und Fettgewebekapsel.

Abhängig von der Ischämiezeit kommt es zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Hyperämie des Nierengewebes in der Reperfusionsphase.

Nach normothermer Ischämiezeit unter 2 Minuten tritt keine Änderung des renalen Blutflusses auf. Durch Ischämiezeiten von 3-5 Minuten wird eine reaktive Hyperämie hervorgerufen, die nach 10-15 Minuten wieder aufgehoben werden kann (Pfeiffer 2005).

Ischämiezeiten von 5-60 Minuten führen ebenfalls zu einer reaktiven Hyperämie, der Blutfluss sinkt allerdings anfänglich unter den ursprünglichen Wert, ehe er sich dann nach Stunden erholt (Pfeiffer 2005).

Nach längeren Ischämiezeiten kann der Ausgangswert der renalen Durchblutung nach einer längeren Erholungsphase gleichermaßen wieder erlangt werden; es kann jedoch auch zu einer dauerhaften Reduktion des renalen Blutflusses kommen (Pfeiffer 2005).

Die Ischämiezeit der in dieser Arbeit angewandten Methode beträgt mehrere Minuten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das Phänomen der renalen Hyperämie in der Reperfusionphase aus diesem Grund eher als gering einzustufen ist.

4.5.2 Weitere renale Schädigungsmodelle - Beispiele der medikamentös-toxischen Varianten

Andere Modelle ermöglichen es, einen *selektiven* Nierenschaden zu erzeugen. Für Medikamente wie das Antimykotikum Amphotericin B oder Aminoglykoside ist eine direkte toxische Wirkung auf Tubuluszellen bekannt.

Bei Amphotericin B kommt es zur direkten tubulären Schädigung aufgrund einer hohen Wirkstoffkonzentration im glomerulären Filtrat (Gerken 1983). Das Ausmaß der Nierenschädigung ist abhängig von der eingesetzten Dosis (Rieger et al. 2007; Oto et al. 2007).

Amphotericin B ist eine selektive Toxizität bei der Behandlung von Pilzkrankungen zuzuschreiben. Grund dafür ist eine geringere Bindung an Cholesterol in Säugetierzellen als an Ergosterol in Pilzzellen (Czub und Baginski 2006). Die Nephotoxizität ist bei der therapeutischen Anwendung von Amphotericin B dosislimitierend (Dorea et al. 1997).

Bei Aminoglykosiden beruht der nephrotoxische Effekt auf einer Schädigung proximaler Tubuluszellen. Aminoglykoside werden hauptsächlich durch glomeruläre Filtration ausgeschieden und zum Teil anschließend durch Phospholipid-Rezeptoren auf der apikalen Membran proximaler Tubuluszellen gebunden und in diese Zellen aufgenommen (Kaloyanides 1994). Da die Aufnahme der Aminoglykoside schneller erfolgt als deren Abbau, kommt es zur Akkumulation in proximalen Tubuluszellen (Kahlmeter und Dahlager 1984). Aminoglykoside treten in Interaktion mit zellulären Strukturen. Hauptmechanismus ist dabei die Bindung an Phospholipide. Es resultieren veränderte Membraneigenschaften mit Neutralisation der Oberflächenspannung, verminderter Permeabilität und Fluidität sowie vermehrter Aggregation (Kaloyanides 1994).

Benedetta Bussolati induzierte in ihrer Arbeit von 2005 eine akute Nierenschädigung durch intramuskuläre Injektion von Glycerol in SCID-Mäuse. Glycerol führt zu weitläufigen tubulo-nekrotischen Arealen. Bussolati's Schädigungsmodell der Glycerol-induzierten Tubulusnekrose basierte dabei auf den Arbeiten von Nath und Zager (Zager et al. 2001; Nath et al. 2000).

Dass Glycerol eine Tubulusnekrose bewirkt, geht auch aus anderen Arbeiten hervor (Homsí et al. 2006; Soares et al. 2002; Ferraz et al. 2002).

Marina Morigi erzeugte im Mausmodell ein akutes Nierenversagen durch subcutane Injektion des Zytostatikums Cisplatin und erforschte daraufhin das Potenzial mesenchymaler Stammzellen an der Tubulusregeneration. Für Cisplatin ist eine tubulotoxische Wirkung beschrieben (Bardi et al. 2007).

Richard A. Zager untersuchte im Mausmodell das Verhalten proximaler Tubuluszellen nach Glycerol-Injektion, Cisplatin-Injektion und unilateralem Ischämie/Reperfusionsschaden.

Er konnte zusammen mit seinem Team in seiner Arbeit zeigen, dass der Toll-like-Rezeptor-4 (TLR-4) ein sensitiver Marker für eine tubuläre Schädigung ist. Es kam zum Verlust der proximalen Tubuluszellen an TLR-4 und Fragmente von TLR-4 erschienen im Urin.

TLR-4 könnte aufgrund seiner frühen Exkretion im Urin die Funktion eines Biomarkers für tubulären Zelltod und drohendes akutes Nierenversagen übernehmen (Zager et al. 2007).

Häufige Auslöser einer tubulotoxischen Nierenschädigung im Klinikalltag sind Röntgenkontrastmittel. Sie sind mittlerweile als dritthäufigste Ursache der Entwicklung eines nosokomialen akuten Nierenversagens angegeben (Agrawal und Stouffer 2002).

Diskutiert werden im Rahmen der Pathogenese der Tubulotoxizität von Röntgenkontrastmitteln Hypoxie und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (Murphy et al. 2000).

Mit Hilfe des Ischämie/Reperfusionss-Modells lässt sich auch das Schädigungsmuster der Niere in Abhängigkeit von der Ischämiezeit modulieren. *Sujata Kale* probierte in ihrem Ischämiemodell an Mäusen verschiedene unilaterale Ischämiezeit in der Zeitspanne von 15-60 Minuten aus, bis sie eine günstige Zeit (in diesem Fall 25 Minuten) für eine gezielte Schädigung des S3-Segments der proximalen Tubuli fand. Dabei führten Ischämiezeiten zwischen 15-20 Minuten zu Zellschwellungen im äußeren Markbereich und nicht zu Nekrosen. Ischämiezeiten von 25-27 Minuten riefen ungleichmäßige nekrotische Arealen der proximalen Tubuluszellen im äußeren Nierenmark hervor und nach

30 Minuten kam es zu einer Verlagerung nekrotischer Bereiche in den Cortex. Kale stellte ebenso fest, dass eine bilaterale Ischämiezeit von 30 Minuten bei Mäusen einen reversiblen Tubulusschaden bewirkt (Kale et al. 2003).

Isabella A. Atencio und Team erzielten einen Nierenschaden in Mäusen unter anderem mittels Glycerol-Injektion und renaler Ischämie durch unilaterale Abklemmung der Nierenarterie.

Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass der größte tubuläre Schaden mit Nekrosen nach Ischämie auftritt. Aber auch Glycerol führt zu umfangreicher Tubulusnekrose, erklärbar durch Induktion von Rhabdomyolyse, Hämoglobinurie und renale Ischämie.

Ischämie-induzierte sowie Glycerol-induzierte Nierenschädigung involvieren mehr Tubuluszellen als interstitielle Zellen (Atencio et al. 1993).

In dieser Arbeit wird davon ausgegangen, dass durch die gewählte Ischämiezeit von mehreren Minuten (weitläufige) Tubulusnekrosen nicht zu erwarten sind. Es wird jedoch aufgrund des komplexen Stoffwechsels und der hohen Sensitivität gegenüber Hypoxie in der Niere eine primäre Schädigung proximaler Tubuluszellen gegenüber anderen renalen Strukturen angenommen.

4.6 Magnet-aktivierte Zellsortierung (MACS)

Die Magnet-aktivierte Zellsortierung wird im Rahmen dieser Dissertation eingesetzt, um humane CD133-positive Progenitorzellen der Nabelschnur in hoher Reinheit zu selektieren und diese Zellen anschließend in hypoxisch geschädigte murine Nieren zu transplantieren.

Das Verfahren der MACS ist von der Firma Miltenyi entwickelt (Miltenyi et al. 1990) und erstmals 1989 zur Selektion humaner CD20-positiver B-Lymphozyten eingesetzt worden (Abts et al. 1989). Wissenschaftler verwenden diese Methode, um gezielt einen Zellpopulationssubtyp zu isolieren.

Das Team um *Rupert Handgretinger* konnte mittels MACS eine Reinheit humaner CD133-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen, gewonnen aus mit G-CFS stimuliertem peripheren Blut, von 94% erzielen (Handgretinger et al. 2003).

Ali Ghodsizad isolierte bei Patienten während einer Herzoperation humane CD133-positive Progenitorzellen aus dem Knochenmark, reinigte sie mit MACS auf 97% auf, um sie anschließend unmittelbar in das geschädigte Myokardgewebe zu injizieren (Ghodsizad et al. 2004).

Stefan Vöö selektierte mit Hilfe von MACS humane CD133-positive Progenitorzellen aus peripherem Blut mit einer Reinheit zwischen 85% und 90% (Vöö et al. 2008).

Daniel Freund und seine Arbeitsgruppe verglichen anhand der MACS-Methode humane CD133-positive Progenitorzellen mit humanen CD34-positiven Progenitorzellen. Sie stellten fest, dass sich unter den CD34-positiven Zellen weniger primitive Progenitorzellen befinden als unter den CD133-positiven Zellen (Freund et al. 2006). Das Team um Freund konnte mittels MACS eine Reinheit von $92,5 \pm 1,8\%$ an CD133-/CD34-doppelt-positiven Progenitorzellen ermitteln. Darunter befanden sich $4,7 \pm 1,2\%$ CD34-einfach-positiv Zellen (Freund et al. 2006).

In dieser Dissertation kann mittels MACS und Optimierung des Verfahrens durch Kühlung und Reduktion der Durchflussgeschwindigkeit beziehungsweise eine längere Verweildauer auf dem Säulenmaterial eine Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen, separiert aus humanem Nabelschnurblut, zwischen 99% und 99,7% erzielt werden. Der Nachweis wird mittels durchflusszytometrischer Messung und Laser-Scanning-Zytometrie erbracht.

4.7 Fluoreszenzfärbung

Durch Färbung Aceton-fixierter muriner Nierengewebeschnitte mit einem humanspezifischen Antikörper gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C können Kreuzreaktionen mit murinen Zellen vermieden werden und somit ist eine gezielte Immunfluoreszenzfärbung sowie fluoreszenzmikroskopische Darstellung der eingesetzten humanen CD133-positiven Progenitorzellen möglich.

Die Zellkerne werden mit DAPI fluoreszenzgefärbt. DAPI eignet sich für die Färbung fixierter Gewebematerialien beziehungsweise für die Färbung toter Zellen; von lebenden Zellen wird es verstoffwechselt. Zwar werden mittels DAPI sowohl humane als auch murine Zellkerne gefärbt, jedoch

handelt es sich nur bei denjenigen Zellen um humane Zellen, die gleichzeitig positiv für humanes HLA sind.

Ob die fluoreszenzmikroskopisch in den murinen Tubuluszellen detektierten humanen Zellen noch nativ oder schon eine Differenzierung in Tubuluszellen erfahren haben, kann durch die Fluoreszenzmikroskopie nicht ausgesagt werden. Deshalb wird im weiteren Verlauf das Verfahren der PCR gewählt. Durch Einsatz humaner tubulusspezifischer Marker (TH-Protein als spezifisch proximaler Tubulusmarker und CD13 als spezifisch distaler Tubulusmarker) kann gezeigt werden, ob die mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesenen integrierten humanen CD133-positiven Progenitorzellen bereits den Differenzierungsweg durchlaufen (haben).

4.8 Gewinnung humaner RNA mittels Laser-Mikrodissektion

Eine neuere Methode, RNA aus fixierten Gewebeschnitten zu gewinnen, ist die Laser-Mikrodissektion. Mit Hilfe eines gepulsten Lasers werden ausgewählte Gewebeareale vom Objektträger ausgeschnitten und in ein Gefäß/Röhrchen zur Weiterverarbeitung aufgenommen.

Für die Untersuchungen in dieser Dissertation werden die per Fluoreszenzmikroskopie detektierten Stammzellareale mittels Laser-Mikrodissektion separiert. Im Anschluss an die Laser-Mikrodissektion wird die Gesamt-RNA (humane und murine RNA) mit dem Invisorb® RNA-Kit I der Firma Invitex isoliert. Durch eine RT-PCR mit humanen und murinen Primern sowie nachfolgende Agarose-Gelaufreinigung kann das RNA-Material genauer untersucht werden beziehungsweise der Nachweis humanen Materials in murinen Nieren erbracht werden.

Die Kombination von Laser-Mikrodissektion mit real-time-RT-PCR wurde von *Doris Porombka* und ihrem Team als effektive Methode vorgestellt, um die zellspezifische virale Transkriptionsleistung des Bornavirus in Neuronen und Astrozyten zu ermitteln und Aussagen über Virus-Empfänger-Interaktionen und Virus-Persistenz-Mechanismen im ZNS zu treffen (Porombka et al. 2008).

Die Forschungsgruppe um *Attila Torkos* konnte per Laser-Mikrodissektion erfolgreich cochleäres Gewebe separieren. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass es durch laserbasierte Mikrodissektion in Kombination mit einer RT-PCR mit entsprechenden Markern im Gegensatz zur konventionellen

manuellen Dissektion möglich ist, einen reinen Spiralganglion-Zellpool zu isolieren ohne Kontamination durch andere Zellen (Torkos et al. 2008).

In der vorliegenden Dissertation werden ebenso Laser-Mikrodissektion und RT-PCR erfolgreich miteinander kombiniert.

4.9 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung hat sich mittlerweile zum festen Standard bei der Chromosomenanalyse etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wird sie eingesetzt, um das humane männliche Y-Chromosom in weiblichen Mäusenieren mit Hilfe einer humanen Y-FISH-Sonde nachzuweisen. Dabei richtet sich die Sonde gegen das Centromer und beide Arme des Y-Chromosoms, da dadurch die Signalintensität steigt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen. Es können vereinzelt Y-FISH-positive Zellen in proximalen Tubuli (<1%) lokalisiert werden.

Jeremy S. Duffield konnte 2005 in hypoxisch geschädigten weiblichen Mäusenieren, die männliche Knochenmarkstammzellen erhalten hatten, lediglich in 0,06% der Tubuluszellen das männliche Y-Chromosom via FISH nachweisen. Nach Dekonvolutions-Mikroskopie stellten sich diese 0,06% noch als artefaktbehaftet heraus (Duffield et al. 2005).

Die Arbeitsgruppe um *Fangming Lin* hingegen detektierte 2003 gleichfalls im reinen Mausmodell in 8% der weiblichen Tubuluszellen hypoxisch geschädigter Mäusenieren, die männliches murines Knochenmark erhalten hatten, das männliche Y-Chromosom (Lin et al. 2003).

Motohiro Nishida konnte 2003 bei einem Mädchen mit einem Nierenschaden einen Nachweis des männlichen Y-Chromosoms mit Hilfe der FISH-Analyse in den Nierentubuli erbringen. Dem Mädchen waren zuvor humane männliche Knochenmarkstammzellen transplantiert worden (Nishida et al. 2003). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, in der ein Zellpopulationssubtyp (CD133-positive hämatopoetische Progenitorzellen der humanen Nabelschnur) zum Einsatz kommt, wurde in den drei zuvor beschriebenen Arbeiten jeweils volles Knochenmark verwendet. Es lässt sich nicht feststellen, welche Zellen des Knochenmarks nun genau die Integration in das Nierenepithel vollzogen.

4.10 Beurteilung der Laser-Scanning-Zytometrie

Bei der Laser-Scanning-Zytometrie werden die Vorteile der analytischen durchflusszytometrischen Bildanalyse und der automatisierten Fluoreszenzmikroskopie kombiniert (Lima und Kültz 2004). 5×10^4 Zellen lassen sich in einem angemessenen Zeitrahmen detektieren (Pachmann et al. 2001). Die analytische Durchflusszytometrie und die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung erfordern Einzellsuspensionen, während die Laser-Scanning-Zytometrie auf einem Objektträger fest lokalisierte adhärente Zellen oder Gewebeschnitte misst. Bereits erfasste Zellen können relokalisiert und nochmals untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wird die Laser-Scanning-Zytometrie eingesetzt, um humane Y-Chromosomen in einer weiblichen murinen Niere aufzusuchen und die Ergebnisse statistisch auszuwerten.

Mittels Laser-Scanning-Zytometrie wird zudem die Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen nach MACS-Aufreinigung ermittelt.

Diese relativ neue Methode der zytometrischen Zellbestimmung hat viele Vorzüge. So ist es durch dieses Verfahren möglich, eine maschinelle, automatisierte Auswertung zu treffen. Während die rein oculäre mikroskopische Analyse fehlerbehaftet sein kann und die Ergebnisse ganz vom Betrachter abhängig und demnach subjektiv belastet sind, handelt es sich bei Laser-Scanning-Zytometrie um ein objektives Verfahren mit dem Vorteil großer Zeitersparnis. Es wird *jede* Zelle über Detektion ihres Zellkerns in die Statistik miteinbezogen, sodass keine Zelle der Auswertung entgeht. Für jede einzelne Zelle kann über ihre mittels Laserenergie angeregten fluoreszierenden Signale eine Aussage bezüglich der untersuchten morphologischen Eigenschaften getroffen werden. Bei der rein betrachtenden Auswertung spielen subjektive Faktoren eine entscheidende Rolle.

Gleichfalls ein Vorteil der Laser-Scanning-Zytometrie ist, dass der Objektträger während der analytischen Auswertung nicht verschoben werden muss, sondern diese Laser, sobald der "richtige" Fokus über die Laser gefunden worden ist, automatisch über den gesamten Gewebeschnitt/die gesamte Zellsuspension "wandern". Bei der mikroskopischen Auswertung über das menschliche Auge muss der Objektträger während der Betrachtung je nach eingesetztem Objektiv (mehrfach) umpositioniert werden, um alle Gebiete des Gewebeschnittes/der Zellsuspension in das Gesamtergebnis miteinzubeziehen, was eine weitere Fehlerquelle der Ergebnisfindung bedeuten kann.

Ein großer Vorteil der Objektträger-basierten Zytometrie liegt darin, dass Zellen relokaliert werden können und Ergebnisse reproduzierbar sind, natürlich im Rahmen der "Haltbarkeit" der Fluoreszenzfärbung. Die Laser-Scanning-Zytometrie basiert auf integralen Fluoreszenzen: Die Fluoreszenz eines Objektes muss in seiner gesamten räumlichen Ausdehnung angeregt und erfasst werden (Sack et al. 2007). Dieser Aspekt ist ein wichtiger Unterschied zur konfokalen Mikroskopie. Bei der konfokalen Mikroskopie wird jeweils nur die Fluoreszenz in der Fokusebene erfasst. Hierin kann jedoch auch ein Nachteil der Laser-Scanning-Zytometrie gegenüber der konfokalen Mikroskopie bestehen: Bei Gewebeschnitten liegen oft mehrere Zelllagen übereinander bedingt durch die Dicke der Schnittführung. Bei *dickeren* Gewebeschnitten ist die Gefahr von Artefakten größer, da durch die Laser-Scanning-Zytometrie unspezifische Signale in die analytische Auswertung miteinbezogen werden können, die sich in einer anderen Fokusebene als der Ebene der untersuchten Struktur (in dieser Arbeit Zellkerne) befinden. *Dünnere* Gewebeschnitte wiederum, bei denen im optimalen Fall alle Zellkerne in einer Ebene liegen, zeigen dieses Problem nicht. Es ist jedoch zu bedenken, dass als Konsequenz weniger Signale zu erwarten sind. So stellt sich der Faktor der Gewebedicke auch in dieser Arbeit als Problem heraus. Es ist leider nicht möglich, auf murinen weiblichen Gewebeschnitten (2- μ m-dicke Paraffinschnitte) männliche humane Y-Chromosomen mit Hilfe der Laser-Scanning-Zytometrie statistisch auszuwerten, da die erfassten Signale artefaktbehaftet und somit keine eindeutigen Ergebnisse ermittelbar sind. Dennoch können wiederum gute Ergebnisse bei der Analyse von Zellsuspensionen eruiert werden. So werden basierend auf der Laser-Scanning-Zytometrie 99% der mittels MACS gewonnenen Zellen als CD133-positiv erkannt.

Bei der Objektträger-basierten Zytometrie müssen die Objekte keine Düse passieren, ihre Größe wird lediglich durch die Maße des Objektträgers festgelegt. Somit sind auch Analysen von adhärennten Zellen möglich, ohne diese vorher "ernten" zu müssen. Die Zellen können auf dem Objektträger kultiviert oder luftgetrocknet und fixiert werden.

Bei der Durchflusszytometrie können die Zellen bedingt durch ihren Fluss durch eine Kapillare nicht relokaliert werden, jede Zelle kann nur einmalig analysiert werden. Eine simultane Messung von Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften eines Zelltypus ist die Grundlage dieser Methode. Es erfolgt jedoch eher eine relative Vermessung von Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzsignale ohne eine feste Bezugsgröße. Basierend auf den Messsignalen findet eine Zuordnung der Zellen zu Zellpopulationen mit ähnlichen Eigenschaften statt (Sack et al. 2007).

Die optische Darstellung sowohl der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung via Durchflusszytometrie als auch der Objektträger-basierten Laser-Scanning-Zytometrie ist mittels Dot-Plots zweidimensional möglich. Bei beiden Methoden erfolgt die Ergebnisfindung über eine Auswertung von Datensätzen.

Wissenschaftler können anhand der Methode der Laser-Scanning-Zytometrie erfolgreich Krebszellen, abstammend von Lungenprimärtumoren, aus peripheren Blutproben von Patienten nach entsprechender Aufbereitung quantifizieren (Rolle et al. 2005; Pachmann et al. 2001).

4.11 Blick in die Zukunft

In dieser Dissertation kann eine Integration humaner CD133-positiver hämatopoetischer Progenitorzellen aus Nabelschnurblut in geschädigte murine Nierentubuli gezeigt werden. Analoge Ergebnisse sind jüngst in einer Studie von *Te-Chao Fang* und Forschungsteam dargelegt worden, nämlich, dass hämatopoetische Knochenmarkstammzellen, jedoch nicht kulturell angezüchtete mesenchymale Stammzellen, an der Regeneration eines akuten tubulären Schadens (in diesem Fall durch HgCl² erzeugt) beteiligt sind (Fang et al. 2008).

CD133-positive Zellen sind phylogenetisch und ontogenetisch betrachtet noch sehr jung und in ihrem Entwicklungspotenzial wenig festgelegt, was sie im Vergleich zu in dieser Hinsicht *älteren* Zellen für eine höhere plastizitäre Flexibilität prädisponiert. Plastizität kann CD133-positiven Progenitorzellen bereits in experimentellen Arbeiten zugeschrieben werden, eine Pluripotenz dieser Zellen wird vermutet, wobei ein Nachweis weiterhin aussteht. Das Charakteristikum der Pluripotenz kann bei embryonalen Stammzellen demonstriert werden, jedoch ist ihre wissenschaftliche Verwendung unter ethischem Aspekt sehr kritisch zu beurteilen, da bei ihrer Gewinnung jedes Mal ein im Grunde noch lebensfähiger Organismus zerstört wird. Der Gewinnung von Stammzellen aus Nabelschnurblut wird aus ethischer Sicht mehr Akzeptanz entgegengebracht, da sie recht einfach und unbedenklich für Mutter und Kind zu gewinnen sind.

Stammzellen der Nabelschnur können in der Zukunft eine entscheidende Rolle in der regenerativen Medizin spielen. Gründe hierfür sind ihre immunologische Unreife und somit das verminderte GvHD-Risiko bei der Transplantation in einen nicht verwandten Spender sowie ihre Fähigkeit, sich auch in Gewebearten außerhalb der ursprünglich vorgegebenen Differenzierungslinie zu entwickeln

(van de Ven et al. 2007). Nabelschnurblut wird zudem bereits der Besitz pluripotenter Stammzellen zugeschrieben (van de Ven et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass CD133-positive hämatopoetische Progenitorzellen Hoffnungsträger in der regenerativen Medizin sind und sie das Repertoire an Therapiestrategien erweitern. Schon in naher Zukunft könnten sie eine entscheidende Rolle im klinischen Alltag bei der Behandlung diverser Erkrankungen spielen. Um dies zu verwirklichen, müssen jedoch noch weitere Studien über ihren Einsatz bei verschiedenen Organerkrankungen erfolgen, wenn möglich verstärkt in humanen Modellen.

5 Zusammenfassung

Ziel: Diese Arbeit untersucht im Rahmen eines Xenotransplantationsmodelles Mensch-Maus, inwieweit hämatopoetische Progenitorzellen des Phänotyps CD133⁺, gewonnen aus humanem Nabelschnurvenenblut, nach der Transplantation in eine hypoxisch geschädigte Mäuseniere das Tubulusepithel zu regenerieren vermögen. Mit Hilfe unterschiedlicher Methoden soll dabei der Nachweis der Integration dieser humanen Stammzellen in das murine Nierengewebe erfolgen.

Hintergrund: Viele Nierenerkrankungen lassen sich bisher nur durch eine Dialyse oder sogar Nierentransplantation behandeln. Eine möglicherweise zukünftig neue Therapieoption renaler Defekte durch Stammzellen könnte dabei eine vielversprechende Alternative darstellen.

In einigen experimentellen Studien ist bereits die Regenerationskapazität von Stammzellen bei renalen Erkrankungen untersucht worden. Dabei sind die Stammzellen durch Knochenmarkpunktion oder nach Mobilisation aus dem peripheren Blut gewonnen worden. Diese Arbeit stellt als neuen Aspekt den Einsatz humanen Nabelschnurblutes in einem Xenotransplantationsmodell Mensch-Maus heraus.

Material und Methoden: Humane CD133-einfach-positive und CD133-/CD34-doppelt-positive Progenitorzellen werden aus Nabelschnurvenenblut mittels Magnet-aktivierter Zellsortierung (MACS) selektiert und anschließend unter die Nierenkapsel durch Anwendung des Ischämie/Reperfusion-Modells geschädigter Mäusenieren transplantiert.

Der Nachweis einer Integration dieser humanen Stammzellen in das murine Tubulusepithel erfolgt durch mehrere Methoden. Fluoreszenzmikroskopisch wird auf gefärbten murinen Nierengewebeschnitten durch Verwendung eines Antikörpers gegen die humanen Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C nach Zellen humanen Ursprungs gesucht. Das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese erweitert die Suche nach humanem Genmaterial auf subzellulärer Ebene. Per Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) werden in weiblichen Mäusenieren humane männliche Stammzellen über das Y-Chromosom markiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

Eine recht junge Methode, nämlich die Laser-Scanning-Zytometrie, ermöglicht eine automatisierte lasergestützte Detektion fluoreszenzgefärbter humaner Zellen. Es kann zum einen die Reinheit CD133-positiver Progenitorzellen nach MACS ermittelt werden, zum anderen wird dieses Verfahren genutzt,

um auf murinen Nierengewebeschnitten - nach Anwendung der FISH-Methode - nach Zellkernen, die zugleich auch das humane Y-Chromosom enthalten, zu suchen. Bei der Reinheitsbestimmung mittels MACS selektierter CD133-positiver Progenitorzellen kommt zusätzlich die Methode der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) zum Einsatz.

Ergebnis: Anhand FACS kann eine Reinheit MACS-selektierter CD133-positiver Progenitorzellen zwischen 99,2% und 99,7% gezeigt werden. Durch die Laser-Scanning-Zytometrie können 99% der nach MACS sortierten Zellen als CD133-positiv detektiert werden. Die Verfahren der Fluoreszenzfärbung mit Hilfe eines selektiv an die Epitope der HLA-Klasse-I A, B, C bindenden Antikörpers, der PCR sowie der FISH ermöglichen den Nachweis humanen Materials in hypoxisch geschädigten murinen Nierentubuli. Die Laser-Scanning-Zytometrie eignet sich hingegen nicht für die Untersuchung von Gewebeschnitten, sodass es mit dieser Methode nicht möglich ist, repräsentative Ergebnisse in Bezug auf den Nachweis humaner fluoreszenzgefärbter Y-Chromosomen in weiblichen Nierentubulusgewebeschnitten zu ermitteln.

Schlussfolgerung: Humanes Nabelschnurvollblut erweist sich als adäquate Quelle adulter hämatopoetischer Stammzellen. CD133-positive hämatopoetische Progenitorzellen nehmen eine Integration in hypoxisch geschädigte Nierentubuli im Xenotransplantationsmodell Mensch-Maus vor. Dieses Ergebnis lässt ein regeneratives Potenzial dieser Zellen bei renalen Erkrankungen vermuten - ein Hoffnungsträger in der regenerativen Medizin.

6 Literaturverzeichnis

Abkowitz JL (2002): Can human hematopoietic stem cells become skin, gut, or liver cells? *N Engl J Med* 346, 770-772

Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H (1989): CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *J Immunol Methods* 125, 19-28

Agrawal M, Stouffer GA (2002): Contrast induced nephropathy after angiography. *Am J Med Sci* 323, 252-258

Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, Itskovitz-Eldor J, Thomson JA (2000): Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278

Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M (2001): Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50, 1691-1697

Atencio IA, Shadan FF, Zhou XJ, Vaziri ND, Villarreal LP (1993): Adult mouse kidneys become permissive to acute polyomavirus infection and reactivate persistent infections in response to cellular damage and regeneration. *J Virol* 67, 1424-1432

Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M (1985): Lactate production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol* 248, 522-526

Bardi E, Bobok I, Olah V, Kappelmayer J, Kiss C (2007): Anthracycline antibiotics induce acute renal tubular toxicity in children with cancer. *Pathol Oncol Res* 13, 249-253

Bayne SR, Donovan DL, Henthorne WA (1994): A rare complication in elective repair of an abdominal aortic aneurysm: multiple transmural colonic infarcts secondary to atheremboli. *Ann Vasc Surg* 8, 290-295

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE (1963): Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454

Bellini MH, Coutinho EL, Filgueiras TC, Maciel TT, Schor N (2007): Endostatin expression in the murine model of ischaemia/reperfusion-induced acute renal failure. *Nephrology (Carlton)* 12, 459-465

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K (2003) et al.: Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776

- Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A et al. (2007): Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110, 3438-3446
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (1999): Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537
- Blantz RC, Deng A (2007): Coordination of kidney filtration and tubular reabsorption: considerations on the regulation of metabolic demand for tubular reabsorption. *Acta Physiol Hung* 94, 83-94
- Blaschke S, Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Puch S, Miosge N, Becker V, Müller GA, Klein G (2002): Expression of cadherin-8 in renal cell carcinoma and fetal kidney. *Int J Cancer* 101, 327-334
- Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S (1994): Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 9, 2110-2117
- Bonventre JV (1993): Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 43, 1160-1178
- Bonventre JV, Weinberg JM (2003): Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* 14, 2199-2210
- Bornstein R, Flores AI, Montalban MA, del Rey MJ, de la Serna J, Gilsanz F (2005): A modified cord blood collection method achieves sufficient cell levels for transplantation in most adult patients. *Stem Cells* 23, 324-334
- Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, Krum H, Kocher AA, Nandurkar H, Bergmann S, Daniell M, O'Day J, Skerrett D et al. (2006): Intra-coronary high-dose CD34⁺ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol* 109, 21-27
- Branch RA (1988): Prevention of amphotericin B-induced renal impairment. A review on the use of sodium supplementation. *Arch Intern Med* 148, 2389-2394
- Broekema M, Harmsen MC, Koerts JA, Petersen AH, van Luyn MJ, Navis G, Popa ER (2005): Determinants of tubular bone marrow-derived cell engraftment after renal ischemia/reperfusion in rats. *Kidney Int* 68, 2572-2581
- Brooks C, Ketsawatsomkron P, Sui Y, Wang J, Wang CY, Yu FS, Dong Z (2005): Acidic pH inhibits ATP depletion-induced tubular cell apoptosis by blocking caspase-9 activation in apoptosome. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, 410-419
- Bush KT, George SK, Zhang PL, Nigam SK (1999): Pretreatment with inducers of ER molecular chaperones protects epithelial cells subjected to ATP depletion. *Am J Physiol* 277, 211-218
- Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G (2005): Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol* 166, 545-555

- Buzanska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domanska-Janik K (2006): Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 15, 391-406
- Castrop H (2007): Mediators of tubuloglomerular feedback regulation of glomerular filtration: ATP and adenosine. *Acta Physiol (Oxf)* 189, 3-14
- Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC (2004): Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 10, 858-864
- Chakraborty J, Below AA, Solaiman D (2004): Tamm-Horsfall protein in patients with kidney damage and diabetes. *Urol Res* 32, 79-83
- Chertow GM, Levy EM, Hammermeister KE, Grover F, Daley J (1998): Independent association between acute renal failure and mortality following cardiac surgery. *Am J Med* 104, 343-348
- Chien CT, Lee PH, Chen CF, Ma MC, Lai MK, Hsu SM (2001): De novo demonstration and colocalization of free-radical production and apoptosis formation in rat kidney subjected to ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 12, 973-982
- Cho HJ, Lee J, Wecker A, Yoon YS (2006): Bone marrow-derived stem cell therapy in ischemic heart disease. *Regen Med* 1, 337-345
- Civin CI, Banquerigo ML, Strauss LC, Loken MR (1987): Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterisation of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol* 15, 10-17
- Conger JD, Weil JV (1995): Abnormal vascular function following ischemia-reperfusion injury. *J Investig Med* 43, 431-442
- Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Buhring HJ, Mattheus U, Mack A et al. (2008): Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-349
- Czub J, Baginski M (2006): Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol and ergosterol - a molecular dynamics study. *J Phys Chem B* 110, 16743-16753
- Dekel B, Shezen E, Even-Tov-Friedman S, Katchman H, Margalit R, Nagle A, Reisner Y (2006): Transplantation of human hematopoietic stem cells into ischemic and growing kidneys suggests a role in vasculogenesis but not tubulogenesis. *Stem Cells* 24, 1185-1193
- Devuyst O, Dahan K, Pirson Y (2005): Tamm-Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. *Nephrol Dial Transplant* 20, 1290-1294

- De Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, Rafferty JA, Burt D, Guenechea G, Bueren JA et al. (1998): CD34⁺AC133⁺ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells* 16, 387-396
- Di Campli C, Piscaglia AC, Pierelli L, Rutella S, Bonanno G, Alison MR, Mariotti A, Vecchio FM, Nestola M, Monego G et al. (2004): A human umbilical cord stem cell rescue therapy in a murine model of toxic liver injury. *Dig Liver Dis* 36, 603-613
- Döhmen G, Reis HE (2002): Stammzellen: Forschung im Überblick. *Dtsch Ärztebl* 99, 2680-2686
- Donovan PJ, Gearhart J (2001): The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97
- Dorea EL, Yu L, De Castro I, Campos SB, Ori M, Vaccari EM, Lacaz CS, Seguro AC (1997): Nephrotoxicity of amphotericin B is attenuated by solubilizing with lipid emulsion. *J Am Soc Nephrol* 8, 1415-1422
- Duffield JS, Park KM, Hsiao LL, Kelley VR, Scadden DT, Ichimura T, Bonventre JV (2005): Restoration of tubular epithelial cells during repair of the postischemic kidney occurs independently of bone marrow-derived stem cells. *J Clin Invest* 115, 1743-1755
- Edelstein CL, Ling H, Schrier RW (1997): The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 51, 1341-1351
- Fang TC, Otto WR, Rao J, Jeffery R, Hunt T, Alison MR, Cook HT, Wright NA, Poulsom R (2008): Haematopoietic lineage-committed bone marrow cells, but not cloned cultured mesenchymal stem cells, contribute to regeneration of renal tubular epithelium after HgCl₂-induced acute tubular injury. *Cell Prolif* 41, 575-591
- Fenton RA, Knepper MA (2007): Mouse models and the urinary concentrating mechanism in the new millennium. *Physiol Rev* 87, 1083-1112
- Ferraz FF, Kos AG, Janino P, Homsi E (2002): Effects of melatonin administration to rats with glycerol-induced acute renal failure. *Ren Fail* 24, 735-746
- Freund D, Oswald J, Feldmann S, Ehninger G, Corbeil D, Bornhauser M (2006): Comparative analysis of proliferative potential and clonogenicity of MACS-immunomagnetic isolated CD34⁺ and CD133⁺ blood stem cells derived from a single donor. *Cell Prolif* 39, 325-332
- Gage FH (2000): Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438
- Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M (2000): Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood* 95, 2813-2820
- Gerkens JF, Heidemann HT, Jackson EK, Branch RA (1983): Effect of aminophylline on amphotericin B nephrotoxicity in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 224, 609-613

- Ghodsizad A, Klein HM, Borowski A, Stoldt V, Feifel N, Voelkel T, Piechaczek C, Burchardt E, Stockschrader M, Gams E (2004): Intraoperative isolation and processing of BM-derived stem cells. *Cytotherapy* 6, 523-526
- Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P et al. (1989): Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 321, 1174-1178
- Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP et al. (1997): Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *N Engl J Med* 337, 373-381
- Goldman RD, Koren G (2004): Amphotericin B nephrotoxicity in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 26, 421-426
- Greger R (2000): Physiology of renal sodium transport. *Am J Med Sci* 319, 51-62
- Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003): Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116, 1827-1835
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W and Hasenfuss G (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440, 1199-1203
- Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G (2007): Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 100, 1615-1625
- Guan Z, Gobe G, Willgoss D, Endre ZH (2006): Renal endothelial dysfunction and impaired autoregulation after ischemia-reperfusion injury result from excess nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, 619-628
- Guder WG, Ross BD (1984): Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* 26, 101-111
- Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kim Y, Rosenberg ME (2002): A role for extrarenal cells in the regeneration following acute renal failure. *Kidney Int* 62, 1285-1290
- Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuçi S (2003): Biology and plasticity of CD133⁺ hematopoietic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 996, 141-151
- Herzog EL, Chai L, Krause DS (2003): Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493
- Hill AE, Shachar-Hill B (1993): A mechanism for isotonic fluid flow through the tight junctions of *Necturus* gallbladder epithelium. *J Membr Biol* 136, 253-262

Homsí E, Janino P, de Faria JB (2006): Role of caspases on cell death, inflammation, and cell cycle in glycerol-induced acute renal failure. *Kidney Int* 69, 1385-1392

Imai E, Ito T (2002): Can bone marrow differentiate into renal cells? *Pediatr Nephrol* 17, 790-794

Imasawa T (2003): Roles of bone marrow cells in glomerular diseases. *Clin Exp Nephrol* 7, 179-185

Imasawa T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Zhong Y, Nagasawa R, Okabe M, Maruyama N, Hosoya T, Ohno T (2001): The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol* 12, 1401-1409

Isacson O (2002): Models of repair mechanisms for future treatment modalities of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57, 839-846

Isacson O, Bjorklund LM, Schumacher JM (2003): Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells. *Ann Neurol* 53, 135-146

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

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA (2001): Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395-1402

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M et al. (2002a): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002b): Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30, 896-904

Kahlmeter G, Dahlager JI (1984): Aminoglycoside toxicity - a review of clinical studies published between 1975 and 1982. *J Antimicrob Chemother* 13, 9-22

Kakinuma S, Asahina K, Okamura K, Teramoto K, Tateno C, Yoshizato K, Tanaka Y, Yasumizu T, Sakamoto N, Watanabe M and Teraoka H (2007): Human cord blood cells transplanted into chronically damaged liver exhibit similar characteristics to functional hepatocytes. *Transplant Proc* 39, 240-243

Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG (2003): Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 112, 42-49

Kaloyanides GJ (1994): Antibiotic-related nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant* 9, 130-134

Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S (2002): Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13, 875-886

- Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S (2001): Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-436
- König A, Müller C, Hasel C, Adler G, Menke A (2006): Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 66, 4662-4671
- Kollet O, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S et al. (2003): HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J Clin Invest* 112, 160-169
- Kondo Y, Kudo K, Igarashi Y, Kuba Y, Arima S, Tada K, Abe K (1992): Functions of ascending thin limb of Henle's loop with special emphasis on mechanism of NaCl transport. *Tohoku J Exp Med* 166, 75-84
- Krause DS (2002): Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther* 9, 754-758
- Krause DS, Ito T, Fackler MJ, Smith OM, Collector MI, Sharkis SJ, May WS (1994): Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 84, 691-701
- Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ (2001): Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377
- Kreisel W, Potthoff K, Bertz H, Schmitt-Graeff A, Ruf G, Rasenack J, Finke J (2003): Complete remission of Crohn's disease after high-dose cyclophosphamide and autologous stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 32, 337-340
- Kruger GM, Morrison SJ (2002): Brain repair by endogenous progenitors. *Cell* 110, 399-402
- Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ (2002): Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* 35, 657-669
- Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R (2006): The aquaporins. *Genome Biol* 7, 206
- Kuçi S, Wessels JT, Buhning HJ, Schilbach K, Schumm M, Seitz G, Löffler J, Bader P, Schlegel PG, Niethammer D and Handgretinger R (2003): Identification of a novel class of human adherent. *Blood* 101, 869-876
- Kucia M, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wu W, Ratajczak J, Machalinski B, Ratajczak MZ (2007): Adult marrow-derived very small embryonic-like stem cells and tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 7, 1499-1514

- Kurbel S, Dodig K, Radic R (2002): The osmotic gradient in kidney medulla: a retold story. *Adv Physiol Educ* 26, 278-281
- Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, Ciocci G, Carrier C, Stevens CE, Rubinstein P (1996): Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med* 335, 157-166
- Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Myers BD (1998): Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest* 101, 2054-2064
- Kwon TH, Nielsen J, Knepper MA, Frokiaer J, Nielsen S (2005): Angiotensin II AT1 receptor blockade decreases vasopressin-induced water reabsorption and AQP2 levels in NaCl-restricted rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 288, 673-684
- Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M (2000): Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234
- Lang P, Bader P, Schumm M, Feuchtinger T, Einsele H, Fuhrer M, Weinstock C, Handgretinger R, Kuci S, Martin D et al. (2004): Transplantation of a combination of CD133⁺ and CD34⁺ selected progenitor cells from alternative donors. *Br J Haematol* 124, 72-79
- Langer T, Beck JD, Gravou-Apostolatu C, Lang P, Handgretinger R, Greil J (2003): Successful treatment of primary refractory acute myeloid leukemia with megadose stem cell transplantation, bone marrow boost and reduced intensity conditioning avoiding chronic graft vs. host disease and severe late toxicity. *Pediatr Transplant* 7, 494-496
- Laughlin MJ (2001): Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *Bone Marrow Transplant* 27, 1-6
- Levicar N, Dimarakis I, Flores C, J. Tracey J, Gordon MY, Habib NA (2007): Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes. *Handb Exp Pharmacol* 180, 243-262
- Lima RN, Kültz D (2004): Laser scanning cytometry and tissue microarray analysis of salinity effects on killifish chloride cells. *J Exp Biol* 207, 1729-1739
- Lin F (2006): Stem cells in kidney regeneration following acute renal injury. *Pediatr Res* 59, 74-78
- Lin F, Cordes K, Li L, Hood L, Couser WG, Shankland SJ, Igarashi P (2003): Hematopoietic stem cells contribute to the regeneration of renal tubules after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 14, 1188-1199
- Loebinger MR, Janes SM (2007): Stem cells for lung disease. *Chest* 132, 279-285
- Loebinger RM, Aguilar S, Janes SM (2008): Therapeutic potential of stem cells in lung disease: progress and pitfalls. *Clin Sci (Lond)* 114, 99-108

Loges S: Selektion, ex-vivo Expansion und Analyse der Differenzierungskapazität humaner CD133 positiver Stammzellen aus dem peripheren Blut. Med. Diss. Hamburg 2004

Lubin BH, Shearer WT (2007): Cord blood banking for potential future transplantation. *Pediatrics* 119, 165-170

Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y (2003): Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 14, 3138-3146

Markiewicz M, Holowiecki J, Wojnar J, Krawczyk-Kulis M, Jagoda K, Giebel S, Kruzel T (2004): Allogeneic transplantation of selected peripheral CD34⁺ cells with controlled CD3⁺ cells add-back in high-risk patients. *Transplant Proc* 36, 3194-3199

Martin GR (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 7634-7638

Mayer J, Doubek M (1998): Must we be really concerned about amphotericin B toxicity in oncology patients? *Cas Lek Cesk* 137, 632-636

McCord JM (1985): Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312, 159-163

Mertelsmann R (2000): Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2, 957-960

Merz K: Analyse hämatopoetischer Progenitorzellen und immunrelevanter Zellen aus Nabelschnurblut im Schwangerschaftsverlauf. Med. Diss. Tübingen 2005

Mezey E, Chandross KJ (2000): Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 405, 297-302

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR (2000): Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782

Miltenyi S, Mueller W, Weichel W, Radbruch A (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11, 231-238

Miraglia S, Godfrey W, Yin AH, Atkins K, Warnke R, Holden JT, Bray RA, Waller EK, Buck DW (1997): A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 90, 5013-5021

Mo L, Huang HY, Zhu XH, Shapiro E, Hasty DL, Wu XR (2004): Tamm-Horsfall protein is a critical renal defense factor protecting against calcium oxalate crystal formation. *Kidney Int* 66, 1159-1166

Moore LC, Marsh DJ (1980): How descending limb of Henle's loop permeability affects hypertonic urine formation. *Am J Physiol* 239, 57-71

Murphy SW, Barrett BJ, Parfrey PS (2000): Contrast nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 11, 177-182

Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J (2000): The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 156, 1527-1535

Nayernia K (2007): Stem cells derived from testis show promise for treating a wide variety of medical conditions. *Cell Res* 17, 895-897

Nishida M, Kawakatsu H, Shiraishi I, Fujimoto S, Gotoh T, Urata Y, Ono T, Hamaoka K (2003): Renal tubular regeneration by bone marrow-derived cells in a girl after bone marrow transplantation. *Am J Kidney Dis* 42, 10-12

Oken DE (1984): Hemodynamic basis for human acute renal failure (vasomotor nephropathy). *Am J Med* 76, 702-710

Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al Awqati Q (2004): The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest* 114, 795-804

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2003): Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 7, 86-88

Oto OA, Paydas S, Disel U, Yavuz S, Seydaoglu G (2007): Amphotericin B deoxycholate (d-AMB) use in cases with febrile neutropenia and fungal infections: lower toxicity with suitable premedication. *Mycoses* 50, 135-139

Pachmann K, Heiss P, Demel U, Titz G (2001): Detection and quantification of small numbers of circulating tumour cells in peripheral blood using laser scanning cytometer (LSC). *Clin Chem Lab Med* 39, 811-817

Pesce M, Orlandi A, Iachininoto MG, Straino S, Torella AR, Rizzuti V, Pompilio G, Bonanno G, Scambia G, Capogrossi MC (2003): Myoendothelial differentiation of human umbilical cord blood-derived stem cells in ischemic limb tissues. *Circ Res* 93, 51-62

Pfeiffer T: Experimentelle Untersuchungen zur Verbesserung der renalen Ischämietoleranz bei aortalen und renalen Gefäßrekonstruktionen durch systemisch applizierbare Perfusionslösungen. *Med. Habil.-Schr. Düsseldorf* 2005

Pohl P, Saparov SM (2000): Solvent drag across gramicidin channels demonstrated by microelectrodes. *Biophys J* 78, 2426-2434

Pompilio G, Cannata A, Peccatori F, Bertolini F, Nascimbene A, Capogrossi MC, Biglioli P (2004): Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg* 78, 1808-1812

Porombka D, Baumgartner W, Herden C (2008): A rapid method for gene expression analysis of Borna disease virus in neurons and astrocytes using laser microdissection and real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 148, 58-65

Ratajczak MZ, Machalinski B, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M (2007): A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 21, 860-867

Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ (1992): Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000): Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404

Rieger FT, Dittmer M, Ostermann H (2007): Liposomal amphotericin B in the treatment of severe fungal infections. Results of a clinical cohort trial. *Dtsch Med Wochenschr* 132, 2062-2066

Rolle A, Guenzel R, Pachmann U, Willen B, Höffken K, Pachmann K (2005): Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC(R) is a predictor for relapse: A preliminary report. *World J Surg Oncol* 3, 18

Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE et al. (1998): Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 339, 1565-1577

Sack U, Tárnok A, Rothe G: *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, 1. Auflage; S. Karger Verlag, Freiburg 2007

Säemann MD, Weichhart T, Horl WH, Zlabinger GJ (2005): Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur J Clin Invest* 35, 227-235

Sankiewicz C: *Alexander Maximows Beitrag zur Theorie der monophytetischen Blutentstehung*. Med. Diss. Bochum 1998

Schlotzer-Schrehardt U, Dietrich T, Saito K, Sorokin L, Sasaki T, Paulsson M, Kruse FE (2007): Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment. *Exp Eye Res* 85, 845-860

Serafini M, Verfaillie CM (2006): Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med* 24, 379-388

Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998): Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13726-13731

Sheridan AM, Bonventre JV (2000): Cell biology and molecular mechanisms of injury in ischemic acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9, 427-434

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J et al. (1999): Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285, 103-106

- Skotnicki AB, Jablonski M, Szostek M, Libura M (1999): Characteristics of the hemopoietic stem cell and its biological marker - the CD34 molecule. *Przegl Lek* 56, 17-21
- Skou JC, Esmann M (1992): The Na, K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 24, 249-261
- Slack JM (2000): Stem cells in epithelial tissues. *Science* 287, 1431-1433
- Smith AG (2001): Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-462
- Snykers S, Vanhaecke T, Rogiers V (2006): Isolation of rat bone marrow stem cells. *Methods Mol Biol* 320, 265-272
- Soares TJ, Costa RS, Volpini RA, Da Silva CG, Coimbra TM (2002): Long-term evolution of the acute tubular necrosis (ATN) induced by glycerol: role of myofibroblasts and macrophages. *Int J Exp Pathol* 83, 165-172
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988): Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58-62
- Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G (2003): Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45-46
- Steinhoff G (2006): Stem cell therapy for the regeneration of heart muscle. *Internist (Berl)* 47, 479-486
- Stephenson JL (1983): The renal concentrating mechanism: fundamental theoretical concepts. *Fed Proc* 42, 2386-2391
- Stocum DL (2001): Stem cells in regenerative biology and medicine. *Wound Repair Regen* 9, 429-442
- Stokman G, Leemans JC, Claessen N, Weening JJ, Florquin S (2005): Hematopoietic stem cell mobilization therapy accelerates recovery of renal function independent of stem cell contribution. *J Am Soc Nephrol* 16, 1684-1692
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P (2001): Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 126, 932-938
- Sueblinvong V, Loi R, Eisenhauer PL, Bernstein IM, Suratt BT, Spees JL, Weiss DJ (2008): Derivation of lung epithelium from human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Am J Respir Crit Care Med* 177, 701-711
- Sutton TA, Molitoris BA (1998): Mechanisms of cellular injury in ischemic acute renal failure. *Semin Nephrol* 18, 490-497
- Takeuchi K (2007): Hypertension and metabolic syndrome/lifestyle diseases. *Rinsho Byori* 55, 452-456

- Telfer EE, McLaughlin M (2007): Natural history of the mammalian oocyte. *Reprod Biomed Online* 15, 288-295
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV (1996): Acute renal failure. *N Engl J Med* 334, 1448-1460
- Thilaganathan B, Nicolaides KH, Morgan G (1994): Subpopulations of CD34-positive haemopoietic progenitors in fetal blood. *Br J Haematol* 87, 634-636
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995): Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7844-7848
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147
- Thorn GW (1971): Approach to the patient with hypertension. *Perspect Biol Med* 14, 578-598
- Till JE, McCulloch EA (1961): A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222
- Tögel F, Lange C, Zander AR, Westenfelder C (2007): Regenerative medicine with adult bone marrow derived stem cells. *Dtsch Arztebl* 104, 1663-1670
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001): Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3, 778-784
- Torkos A, Wissel K, Warnecke A, Lenarz T, Stover T (2008): Technical report: Laser microdissection and pressure catapulting is superior to conventional manual dissection for isolating pure spiral ganglion fractions from the cochlea. *Hear Res* 235, 8-14
- Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP (2003): Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-49
- Van de Ven C, Collins D, Bradley MB, Morris E, Cairo MS (2007): The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration. *Exp Hematol* 35, 1753-1765
- Vetterlein F, Petho A, Schmidt G (1968): Distribution of capillary blood flow in rat kidney during postischemic renal failure. *Am J Physiol* 251, 510-519
- Vöö S, Eggermann J, Dunaeva M, Ramakers-van Oosterhoud C, Waltenberger J (2008): Enhanced functional response of CD133⁺ circulating progenitor cells in patients early after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 29, 241-250
- Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, McGlave PB, Sender L, Cairo MS (1996): Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 88, 795-802

Weichhart T, Zlabinger GJ, Säemann MD (2005): The multiple functions of Tamm-Horsfall protein in human health and disease: a mystery clears up. *Wien Klin Wochenschr* 117, 316-322

Weiss DJ, Liggitt D, Clark JG (1999): Histochemical discrimination of endogenous mammalian beta-galactosidase activity from that resulting from lac-Z gene expression. *Histochem J* 31, 231-236

Yang X, Qu L, Wang X, Zhao M, Li W, Hua J, Shi M, Moldovan N, Wang H, Dou Z (2007): Plasticity of epidermal adult stem cells derived from adult goat ear skin. *Mol Reprod Dev* 74, 386-396

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW (1997): AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90, 5002-5012

Zager RA, Andoh T, Bennett WM (2001): Renal cholesterol accumulation. A durable response after acute and subacute renal insults. *Am J Pathol* 159, 743-752

Zager RA, Johnson AC, Lund S, Randolph-Habecker J (2007): Toll-like receptor (TLR4) shedding and depletion: acute proximal tubular cell responses to hypoxic and toxic injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 292, 304-312

Zeisberg M, Kalluri R (2004): The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 82, 175-181

Zeisberg M, Strutz F, Müller GA (2001): Renal fibrosis: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 10, 315-320

Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H, Mammoto T, Charytan D, Strutz F, Kalluri R (2003): BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 9, 964-968

Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R (2005): Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 280, 8094-8100

Publikationen im Rahmen dieser Dissertation

In Journalen:

- Wessels JT, Busse AC, Seitz G, Mahrt J, **Hoffschulte B** and Müller GA: Visualizing cell traffic of single tumor cells live and in vivo by a new intravital microscopy approach. Cytometry, Volume 71 A, Issue 9, September 2007 (DGfZ Abstract)
- Wessels JT, Busse AC, Tepper-Wessels K, Mahrt J, **Hoffschulte B**, Grabbe E and Müller GA: Molecular imaging in vivo - a comparative overview. Cytometry, Volume 71 A, Issue 9, September 2007 (DGfZ Abstract)

Als Poster-Vortrag:

- **Hoffschulte B**, Schimmöller L, Mahrt J, Tepper-Wessels K, Müller GA, Wessels JT: Migration of human CD133⁺ stem cells to murine hypoxic kidneys - a xenotransplantation study. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie - GfN - und 41. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie - DAGKN, 27. - 30. September 2008
- Schimmöller L, **Hoffschulte B**, Mahrt J, Tepper-Wessels K, Müller GA, Wessels JT: Spontaneous cell fusion between human renal fibroblasts and cord blood stem cells in vitro. 39. Kongress der Gesellschaft für Nephrologie - GfN - und 41. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Klinische Nephrologie - DAGKN, 27. - 30. September 2008

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Leiter der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen Prof. Dr. med. Gerhard A. Müller für die Vergabe dieses interessanten und aktuellen Forschungsthemas.

Ebenso möchte ich nicht minder Herrn Dr. rer. nat. Johannes T. Wessels, dem Leiter des Labors für molekulare Nephrologie der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie und der Core Facility Molecular & Optical Live Cell Imaging (MOLCI) der Universitätsmedizin Göttingen, für seine hervorragende Betreuung bei der Planung, der experimentellen Durchführung und der Niederschrift dieser Arbeit danken. Gedankt seien die unzähligen Stunden, die er in meine Arbeit investiert und damit sehr zu ihrem Gelingen beigetragen hat.

Als weiteres gebührt mein Dank dem Mitarbeiter des Labors für molekulare Nephrologie Herrn Jens Mahrt für seine Hilfestellungen bei den methodischen Ausführungen dieser Arbeit. Mit seinem Wissens- und Erfahrungsreichtum stand er mir stets beratend zur Seite.

Darüber hinaus möchte ich dem Team der geburtshilflichen Abteilung des Krankenhauses Neumariahilf in Göttingen und ganz besonders Frau Dr. med. Kathrin Tepper-Wessels, die für mich verlässlich zu jeder Tages- und Nachtzeit Nabelschnurblut abnahm, danken.

Ein großes Dankeschön geht an die Mitarbeiter/-innen der Pathologie der UMG für ihre Hilfeleistungen und die Bereitstellung humanen Organmaterials.

Den Mitarbeitern/-innen der Tierabteilung der UMG sei gedankt für die pflegerische Betreuung der Mäuse.

Bei allen Labormitarbeitern/-innen und meinen Mit-Doktoranden/-innen möchte ich mich für das angenehme, entspannte Arbeitsklima bedanken. Die Zusammenarbeit hat mir sehr viel Spaß gemacht.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, die mir diese Dissertation erst ermöglichten und mir bei ihrer Anfertigung fachlich wie menschlich unterstützend zur Seite standen, meinen Dank aussprechen. Zudem danke ich meinen Schwestern für die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 22.07.1981 wurde ich in Meppen geboren. Von 1988-1992 besuchte ich die Grundschule Marienschule in Meppen. 1992 wechselte ich auf das Gymnasium Marianum in Meppen, wo ich 2001 die Allgemeine Hochschulreife erwarb.

Im Frühjahr 2002 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen, wo ich im Jahr 2004 den ersten und 2008 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ablegte.

Das Praktische Jahr (2007 bis 2008) verbrachte ich im Krankenhaus Neu-Maria Hilf in Göttingen in den Bereichen Innere Medizin, Chirurgie und Gynäkologie.

Ende des Jahres 2006 begann ich in der Abteilung Nephrologie und Rheumatologie der Universitätsmedizin Göttingen meine Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin.