

Meinen Eltern gewidmet



Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Nephrologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle der endothelialen NO-Synthase bei der Entstehung der  
Transplantationsvaskulopathie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Dominik Kampmann

aus Herne

Datum der Promotion: 09.09.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Abstrakt</b> .....	<b>IX</b>
A.1 Deutsch .....	IX
A.2 Englisch .....	X
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung .....	1
1.1.1 Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz.....	1
1.2 Behandlungsmöglichkeiten der terminalen Niereninsuffizienz und deren Risiken.....	2
1.3 Transplantation und Abstoßungsreaktion.....	2
1.4 Aufbau der Arterienwand.....	6
1.5 Remodelling.....	6
1.6 Neointima und Transplantationsvaskulopathie.....	7
1.7 Herkunft der glatten Muskelzellen der Neointima.....	8
1.8 Stickstoffmonoxid (NO).....	10
1.9 Stickstoffmonoxid Synthasen (NOS) und deren Einfluss auf Gefäße .....	10
1.9.1 eNOS.....	11
1.9.2 iNOS.....	11
1.9.3 nNOS.....	12
<b>2 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>13</b>
<b>3 Materialien</b> .....	<b>15</b>
3.1 Antikörper .....	15
3.2 Puffer und Lösungen .....	16
3.3 Chemikalien und Reagenzien.....	16
3.4 Geräte und Instrumente.....	18
<b>4 Methoden</b> .....	<b>20</b>
4.1 Tiermodell.....	20
4.1.1 Transplantationsmodell .....	20
4.1.2 Histologie.....	22
4.1.3 Immunhistochemie .....	22

4.2	Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).....	24
4.3	Statistische Methoden .....	25
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>27</b>
5.1	Morphometrie und Neointima Bildung .....	27
5.1.1	HE Färbung .....	27
5.2	Alpha-Aktin-positive glatte Muskelzellen .....	28
5.3	Nachweis von Adhäsionsmolekülen .....	29
5.4	Nachweis von Lymphozyten (CD3, CD4 und CD8).....	31
5.5	Nachweis von Makrophagen durch F4-80.....	32
5.6	Nachweis der Herkunft der eingewanderten Zellen durch H-2Kb .....	33
5.7	Nachweis von cGMP .....	34
5.8	Nachweis der NOS-Isoformen.....	35
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>38</b>
6.1	Diskussion der Versuchsergebnisse .....	38
6.1.1	Unterschiede in der Neointima Bildung zwischen eNOS Knockout Mäusen und der Kontrollgruppe .....	39
6.1.2	Das Verhalten der Entzündungszellen in beiden Gruppen und deren Herrkunft .....	40
6.1.3	Das Verhalten und die Herkunft der glatten Muskelzellen in den beiden Gruppen.....	41
6.1.4	Herkunft von NO, Rolle der NO Synthasen.....	42
6.1.5	Expression der verschiedenen NOS und cGMP in unserem Model und Konsequenz .....	43
6.1.6	iNOS.....	43
6.1.7	nNOS.....	45
6.1.8	Kompensation von iNOS und nNOS bei eNOS Mangel.....	45
6.2	Zusammenfassung und Ausblick.....	46
6.3	Bedeutung der experimentellen Befunde für zukünftige Behandlungsmöglichkeiten der Transplantationsvaskulopathie.....	47
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XI</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>XVI</b>
	<b>Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen</b> .....	<b>XVII</b>

<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>XX</b>
<b>Danksagungen .....</b>	<b>XXI</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ablauf der Transplantationsvaskulopathie Modifiziert .....	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Gefäßtransplantation .....	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Gefäßtransplantation .....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Gefäßtransplantation .....	21
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Gefäßtransplantation .....	21
Abbildung 6: HE Färbung .....	27
Abbildung 7: Alpha-Aktin-positive glatte Muskelzellen .....	29
Abbildung 8: Nachweis von Adhäsionsmolekülen (VCAM) .....	30
Abbildung 9: Nachweis von Adhäsionsmolekülen (PECAM) .....	31
Abbildung 10: Nachweis von Lymphozyten CD8 .....	32
Abbildung 11: Nachweis von Makrophagen durch F4-80 .....	33
Abbildung 12: Nachweis der Herkunft der eingewanderten Zellen durch H-2Kb .....	34
Abbildung 13: Nachweis von cGMP .....	35
Abbildung 14: Nachweis der NOS-Isoformen .....	37

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Nicht-immunologische und immunologische Faktoren der chronischen Abstoßung.....	5
Tabelle 2: Antikörper.....	15
Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien .....	16
Tabelle 4: Geräte und Instrumente .....	18
Tabelle 5: Primer und Sonden der quantitativen Echtzeit PCR.....	25

# Abstrakt

## A.1 Deutsch

Chronische Nierenerkrankungen stellen eine große Herausforderung an das Gesundheitssystem dar. Bei einer terminalen Niereninsuffizienz ist die Nierentransplantation die Therapie der Wahl für die betroffenen Patienten. Die chronische Transplantatabstoßung gilt heute als wichtigster limitierender Faktor für eine dauerhafte Funktion des Transplantates. Eine Ursache der chronischen Transplantatabstoßung ist die Transplantationsvaskulopathie.

Um die Rolle der Stickstoffmonoxid Synthasen (NOS) und im Besonderen der endothelialen Stickstoffmonoxid Synthase (eNOS) für die Transplantationsvaskulopathie zu untersuchen, wurde Spendermäusen vom Stamm BALB/c die absteigende Aorta thoracalis entnommen. Das Gefäß wurde daraufhin in zwei Empfängergruppen transplantiert. Die eine Gruppe bestand aus Wildtyp Mäusen des C57BL/6J Stammes, die andere Gruppe aus homozygoten eNOS Knockout Mäusen (eNOS<sup>-/-</sup>) aus dem C57BL/6J Stamm.

Bereits nach 4 Wochen war eine deutliche Neointimabildung, eine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen und eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen in den Wildtyp Mäusen zu sehen. Die Empfängermäuse der eNOS<sup>-/-</sup> Gruppe dagegen waren vor der Neointimabildung geschützt. Der protektive Mechanismus war auf eine signifikante Erhöhung der Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) zurückzuführen, wie anhand einer erhöhten intraaortalen Synthese von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) gezeigt werden konnte. Die Erhöhung der Synthese ging auf die Hochregulation der induzierbaren NOS (iNOS) und der neuronalen NOS (nNOS) zurück.

Die erhöhte Aktivität von iNOS und nNOS könnte eine wichtige Rolle bei der Verhinderung der Transplantationsvaskulopathie spielen.

## A.2 Englisch

Chronic kidney disease is one of the biggest challenges for the health care system. Kidney transplantation is considered the optimal therapy. Chronic transplant rejection is the main limiting factor. Transplant vasculopathy is one of its most important causes.

The role of nitric oxide synthases (NOS) and especially endothelial NOS (eNOS) was studied in a murine model of aortic allograft rejection. The descending thoracic aorta of donor mice (BALB/c mice) was transplanted into two groups of recipients: (a) C57BL/6J wildtype mice and (b) C57BL/6J mice homozygous for a knockout of the eNOS gene (eNOS<sup>-/-</sup>).

After 4 weeks, pronounced neointima formation, upregulated expression of adhesion molecules, and increased infiltration by inflammatory cells were demonstrated in wild-type recipient mice, whereas eNOS<sup>-/-</sup> recipient mice were protected from neointima development by a significantly increased synthesis of NO, as shown by increased formation of cyclic guanosine monophosphate (cGMP); this was mainly explained by upregulation of inducible NOS (iNOS) and neuronal NOS (nNOS).

Upregulation of iNOS and nNOS isoforms may be beneficial in preventing allograft arteriosclerosis in the early posttransplant period.

# **1 Einleitung**

## **1.1 Einführung**

### **1.1.1 Epidemiologie der chronischen Niereninsuffizienz**

Die chronische Niereninsuffizienz stellt eine große Herausforderung an das Gesundheitssystem dar. Insbesondere Patienten mit dem Endstadium dieser Erkrankung – der terminalen Niereninsuffizienz – haben eine deutlich erhöhte Morbidität und Mortalität.

Im Jahre 2006 litten in Deutschland laut Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation der QuaSi-Niere GmbH etwa 90.000 Menschen an einer terminalen Niereninsuffizienz [1]. Insgesamt hat die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz in den letzten Jahrzehnten drastisch zugenommen [2]. Die Ursachen für die chronische Niereninsuffizienz sind mannigfaltig. Sie kann bedingt durch primär nephrogene Erkrankungen wie Glomerulonephritiden aber auch als Folge von systemischen Erkrankungen aller Art (vaskulär, entzündlich, neoplastisch) oder durch externe Noxen (Medikamente, Giftstoffe) auftreten. Einen Sonderstatus nehmen dabei allerdings zwei Krankheiten ein, die ein globales Problem darstellen: Diabetes mellitus Typ II und arterielle Hypertonie [3]. Im Jahre 2004 litten ungefähr 146 Millionen Menschen weltweit an Diabetes mellitus Typ 2 und man muss damit rechnen, dass diese Zahl sich bereits im Jahr 2010 verdoppelt hat [4]. Eine schottische Studie konnte zeigen, dass die Prävalenz terminaler Niereninsuffizienz bei Typ II Diabetikern bei 0,35% lag [5] und somit umgerechnet etwa 51 Millionen Diabetiker weltweit an einer terminalen Niereninsuffizienz litten.

Die zweite besonders hervorzuhebende Krankheit, die zu terminalem Nierenversagen führt, ist der Bluthochdruck. Im Rahmen des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 wurde die Prävalenz der arteriellen Hypertonie in verschiedenen Altersgruppen untersucht. In der Altersgruppe von 50-59 Jahren hatten ca. 60% der Bevölkerung einen Bluthochdruck, und in der Gruppe von 60-69 Jahren hatten ca. 80% aller deutschen einen Bluthochdruck. Eine arterielle Hypertension führt in der Regel unbehandelt nach 15-20 Jahren zur hypertensiven Nephropathie, die häufig in der chronischen und terminalen Niereninsuffizienz endet [6].

## **1.2 Behandlungsmöglichkeiten der terminalen Niereninsuffizienz und deren Risiken**

Im Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007 [1] befanden sich zum Stichtag 72,5% aller terminalen Niereninsuffizienzpatienten in Dialysebehandlung und 27,5% in Nachsorge nach Nierentransplantation. Die Hämodialyse ist die häufigste Behandlungsform der terminalen Niereninsuffizienz. Die durchschnittliche Lebenserwartung bei 65-74 Jahre alten Menschen, die im *European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Register* erfasst wurden, beträgt ca. 5 Jahre und ist damit um 50% geringer als in der Gesamtbevölkerung [7]. Hierbei sind kardiovaskuläre Erkrankungen die Haupttodesursache. Dies ist auch bei jungen Menschen der Fall. Bei einer Studie von Levey et al. war die jährliche Mortalität bei 25-34 jährigen Dialysepatienten vergleichbar mit der von über 85 jährigen aus der Allgemeinbevölkerung [8].

## **1.3 Transplantation und Abstoßungsreaktion**

Die Nierentransplantation ist die Behandlung der Wahl bei terminaler Niereninsuffizienz [9]. Zum Einen sind Lebensqualität und Überleben gegenüber der Dialysebehandlung besser, zum Anderen ist die Transplantation kostengünstiger als die Dialysebehandlung [10]. Dies ist nahezu unabhängig vom Alter des transplantierten Patienten [11]. Das gegenwärtige Hauptproblem besteht jedoch im Mangel an Spenderorganen [10].

Leider ist die Überlebenszeit von transplantierten Nieren begrenzt. Sie beträgt gegenwärtig im Durchschnitt ca.10-15 Jahre. Hauptgründe für die begrenzte Überlebenszeit sind Abstoßungsreaktionen des Spenderorgans. Hierbei unterscheidet man akute und chronische Abstoßungsreaktionen.

Es gibt zwei Formen der akuten Abstoßung:

### ***1. Die akute zelluläre Nierentransplantat-Abstoßung***

Sie wird charakterisiert durch die Infiltration des Transplantats durch Lymphozyten, die gegen Spender- Antigene aktiviert wurden. Histologisch findet sich bei der akuten zellulären Abstoßung zudem eine interstitielle Infiltration mit mononukleären, gelegentlich auch eosinophilen Zellen [12].

## *2. Die akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion*

Bei der akuten Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion (acute antibody mediated rejection) muss per definitionem eine morphologische Evidenz für einen akuten Gewebeschaden vorliegen, sowie zirkulierende Spender-spezifische Antikörper. Darüber hinaus ist eine immunologische Evidenz für einen Antikörper-vermittelten Prozess (positiver Nachweis von C4d in der Transplantat Biopsie) gefordert. Histologisch sieht man eine Kapillarendothelschwellung, arterioläre fibrinoide Nekrosen, Fibrinthrombi in glomerulären Kapillaren und in schweren Fällen kortikale Nekrosen. Plasmazellen, die sonst nur etwa 10% der gesamten Zellen ausmachen, können in der akuten antikörpervermittelten Abstoßung prädominant sein [13]. Es gilt als gesichert, dass Anzahl und Schwere von akuten Abstoßungen eine prognostische Bedeutung für das Langzeitüberleben von transplantierten Nieren haben [14, 15]. In den letzten Jahrzehnten konnte jedoch die Zahl der akuten Abstoßungen durch die Erfindung bzw. individualisierte Anwendung von neueren Immunsuppressiva dramatisch gesenkt werden [16].

## *3. Die chronische Transplantatabstoßung*

Bei der chronischen Transplantatabstoßung handelt es sich um ein multifaktorielles Ereignis mit Einbeziehung immunologischer und nicht-immunologischer Faktoren. Im Rahmen der erneuerten Banff-Klassifikation aus dem Jahre 2005 wurde die frühere englischsprachige Bezeichnung "chronic allograft nephropathy" in "interstitial fibrosis and tubular atrophy (IFTA)" umbenannt, da die Bezeichnung "chronic allograft nephropathy" die zu Grunde liegenden Ursachen nicht ausreichend benannte [17]; trotzdem sind Bezeichnungen wie "chronic allograft rejection" und "chronic allograft nephropathy" sowohl in der klinischen Praxis als auch in der Literatur weiter gebräuchlich .

Die klinische Diagnose wird durch den Befund eines langsam steigenden Plasma-Kreatinins, eine zunehmende Proteinurie und die Entwicklung oder Verschlimmerung einer arteriellen Hypertension gestellt [18, 19].

Histologische Veränderungen der chronischen Abstoßung spielen sich auf folgenden Ebenen ab:

Die glomerulären Kapillarwände erscheinen verdickt, teilweise mit einer Doppelkontur wie bei der membranoproliferative Glomerulonephritis (MPGN), aber ohne „dense

depositis“; darüber hinaus finden sich Zeichen einer interstitiellen Fibrose [20, 21]. Das Interstitium zeigt in variierendem Maße fibröse Flächen und fokale zelluläre Infiltrate mit Lymphozyten und Plasmazellen, tubuläre Atrophie und „tubular cell drop out“ (letzteres ähnelt dem Bild der Calcineurininhibitor-Nephrotoxizität) [21]. In den peritubulären kapillaren Basalmembranen finden sich darüber hinaus eine Aufspaltung das sogenannte „Splitting“ und Übersichtung [21]. Vor Sicherstellung der Diagnose müssen andere Krankheiten, die histologisch der chronischen Abstoßung ähneln, ausgeschlossen werden. Hierzu zählen die MPGN, die membranöse Glomerulonephritis und/oder eine interstitielle Fibrose durch z.B. Cyclosporinbehandlung [20].

Immunologische Faktoren umfassen akute zelluläre oder antikörpervermittelte Abstoßung, chronische antikörpervermittelte Abstoßung und Rezidiv der Grunderkrankung im Transplantat [22].

Zu den nicht-immunologischen Faktoren zählen neben der arteriellen Hypertension die glomeruläre Hyperfiltration und Hypertrophie: die Glomeruli hypertrophieren und steigern die Filtrationsrate nach der Transplantation. Dieses führt wahrscheinlich zur intraglomerulären Hypertension und dadurch zur Schädigung der glomerulären Kapillarwand [23]. Die akute tubuläre Nekrose wird als häufigste Ursache für die verspätete Grafffunktion angesehen [24].

Eine häufig bestehende Hyperlipidämie wird zu den nicht-immunologischen Faktoren gezählt, da pathologische Gemeinsamkeiten mit der Arteriosklerose angenommen werden, welche jedoch bislang nicht bewiesen werden konnten [25]. Des Weiteren spielen verschiedene zeitabhängige Faktoren eine Rolle. Zwei Typen werden hierbei unterschieden: Zum Einen die frühe Schädigung, welche innerhalb eines Jahres auftritt und meist durch immunologische Faktoren bedingt ist [26], zum Anderen der späte Schaden, der durch glomeruläre Sklerose und tubulointerstitielle Schädigung mit progressiver arteriolärer Hyalinose mit Gefäßverengung als Ausdruck der Transplantationsvaskulopathie charakterisiert ist [26].

Die Überlebensdauer eines transplantierten Organs wird auf lange Sicht durch die chronische Abstoßungsreaktion bestimmt [26]. Sie ist die Hauptursache des teilweisen bzw. vollständigen Funktionsverlusts des Transplantates .

Die chronische Abstoßung ist somit ein multifaktorieller Prozess, an dem immunologischen und nicht-immunologischen Faktoren beteiligt sind [27]. Diese sind in Tabelle 1 zusammengestellt, modifiziert nach dem "Renal Transplantation Oxford Handbook"[22].

**Tabelle 1: Nicht-immunologische und immunologische Faktoren der chronischen Abstoßung**

<b>Nicht-immunologische Faktoren</b>	<b>Immunologische Faktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Präexistierende Donorerkrankung</li> <li>• Schädigung des Organs bei Entnahme bzw. bei der Transplantation</li> <li>• Ischämie-Reperfusionsschaden</li> <li>• Obstruktion der Ureteren oder der Blase</li> <li>• Wiederkehrende Blasenentzündung mit Pyelonephritiden</li> <li>• Calcineurininhibitor Toxizität</li> <li>• Arterielle Hypertension</li> <li>• BK Virus Nephropathie</li> <li>• New-Onset Diabetes After Transplantation (NODAT)</li> <li>• Atheromatöse Gefäßerkrankungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Akute zelluläre oder Antikörper-vermittelte Abstoßung</li> <li>• Chronische Antikörper-vermittelte Abstoßung</li> <li>• Rezidiv der Grunderkrankung im Transplantat</li> </ul>

Die chronische Abstoßung ist klinisch durch eine langsame Funktionsverschlechterung gekennzeichnet.

Im Rahmen einer chronischen Abstoßung der Transplantatniere kommt es in den arteriellen Gefäßen zu charakteristischen Veränderungen, die als Transplantationsvaskulopathie bezeichnet werden [27]. Die Transplantationsvaskulopathie (TV) als Ursache der chronischen Abstoßung ist der wichtigste Faktor für den späteren Verlust des Organs nach Nieren- und auch Herztransplantationen [28].

## 1.4 Aufbau der Arterienwand

Die Arterienwand besteht aus drei Schichten. Die innerste Schicht, die Intima, besteht aus einem dem Lumen zugewandten Endothel. Das Endothel sitzt auf einer Basalmembran, die von einer dünnen Schicht extrazellulärer Matrix überlagert ist. Unter dieser Schicht befindet sich, abgegrenzt von der inneren elastischen Lamina, die Media. Letztere besteht aus glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix. Dieser Gefäßabschnitt ist verantwortlich für den Vasotonus, der durch metabolische und hormonale Stimuli gesteuert wird [27]. Die äußerste Schicht, „Adventitia“, wird von der Media durch die externe elastische Lamina getrennt. Sie besteht aus Myofibroblasten, vereinzelt Entzündungszellen, autonomen Nervenfasern und extrazellulärer Matrix. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die Adventitia nur eine Art Stütze des Gefäßes darstellt, aktuelle Hinweise deuten jedoch darauf hin, dass sie darüber hinaus direkt in die Regulierung des Vasotonus eingreift [27].

## 1.5 Remodelling

Grundsätzlich können alle drei Gefäßwandschichten den luminalen Durchmesser beeinflussen [27]. Diese Effekte lassen sich in positives Remodelling (Erweiterung des Lumens) und negatives Remodelling (Reduktion des Lumendurchmessers) einteilen. Ein Beispiel für das Zusammenspiel der Umbauprozesse ist, dass bei früher Arteriosklerose der luminalen Fluss, trotz fokaler Verdickung, durch assoziiertes positives Remodelling, genauer gesagt durch kompensatorische Erweiterung des Gefäßlumens, erhalten bleibt [29]. Intimale Hyperplasie durch das Rekrutieren von Entzündungszellen und Smooth Muscle Like Cells (SMLCs) in der Intima, so wie die Zunahme von extrazellulärer Matrix können das Gefäßlumen direkt verengen. Eine Fibrose der Adventitia vermindert die Fähigkeit der perivaskulären extrazellulären Matrix zum positiven Remodelling und führt auf diesem Wege indirekt zu einer Verkleinerung des Lumens. Ein erhöhter medialer Tonus (z.B. sekundär durch eine reduzierte Produktion von Vasodilatoren) kann, selbst wenn er potentiell reversibel ist, zu einer Lumenverengung führen [27].

Unter dem Einfluss von arteriellem Hochdruck wird durch den Verlust von medialen glatten Muskelzellen oder extrazellulärer Matrix eine Gefäßdilatation begünstigt. Im Gegensatz dazu stehen die nach einer Transplantation stattfindenden Vorgänge, z.B.

Reaktionen mit alloreaktiven T-Zellen, Antikörpern und Makrophagen des Empfängers, die zur Apoptose der medialen glatten Muskelzellen führen können [27]. Dies führt dann zu einem negativen Remodelling mit konsekutiver Lumeneinengung.

## **1.6 Neointima und Transplantationsvaskulopathie**

Wie bereits zuvor beschrieben, stellt die Transplantationsvaskulopathie (TV), oder auch Allograft-Arteriosklerose genannt, den möglicherweise wichtigsten Faktor der chronischen Transplantatabstoßung dar. Die Transplantationsvaskulopathie entsteht durch die Bildung einer so genannten „Neointima“, ein fortschreitendes inwendiges Remodelling, das sowohl Intima wie auch Media einbezieht [27]. Hierdurch wird das Gefäßlumen der transplantierten Organe in dem Maße verengt, dass der Blutfluss lokal stark herabgesetzt wird [27]. Dies führt im weiteren Verlauf zur Ischämie im entsprechenden, durch das Gefäß versorgte Gebiet und damit schließlich zum Organverlust .

Die pathophysiologischen Mechanismen, die der Neointimabildung zu Grunde liegen, wurden in Mausmodellen untersucht. Bereits zwei bis vier Wochen nach Transplantation konnte eine deutliche Neointimabildung hervorgerufen werden [30-32]. In Versuchen, bei denen Aortenabschnitte in jeweils vollständig histoinkompatible Mäuse bzw. Rattenstämme eingepflanzt wurden, ergaben sich Hinweise dafür, dass die Bildung der Neointima von den Zellen des Empfängers und nicht von den Zellen des Spenders ausgeht [33-35]. Dieser Umstand konnte in weiteren Versuchen bestätigt werden, unter anderem in einem allogenen Herztransplantationsmodell in Ratten [36] und in einem Versuch, der Gefäßveränderungen in Biopsien von menschlichen Nierentransplantatempfängern untersuchte [37].

Anhand eines Rattenmodells, bei dem infrarenale Aorten zwischen Fischer - und Lewis -Ratten transplantiert wurden, konnte der zeitliche Ablauf der TV gezeigt werden [28]:

Eine Woche nach Transplantation kam es zum Verlust des Endothels, Adhäsion von Plättchen und Leukozyten an der subendothelialen Matrix und Modifikation von glatten Muskelzellen in der Media. Diese zeigten ultrastrukturelle Veränderungen, welche als charakteristisch für glatte Muskelzell-Aktivierung gelten, d.h. Verlust von Myofilamenten und Formation eines prominenten endoplasmatischem Retikulums und Golgi-Apparats. Die Autoren sahen dies als Ausdruck für einen Umbau der glatten Muskelzellen vom

kontraktilen zum synthetischen Phänotypen [28]. Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen infiltrierten die Adventitia und Intima. Nach vier bis acht Wochen kam es zur maximalen Ausweitung der Neointima und einer Zunahme der extrazellulären Matrix. Glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMC) und Monozyten/Makrophagen fanden sich in der Neointima und Media. Ein Verlust von Alpha-Aktin-positiven glatten Muskelzellen ( $\alpha$ -SMA+), und ein Akkumulieren von Entzündungszellen in der Neointima wurde beschrieben. Später waren weniger Entzündungszellen, aber vermehrt Endothelzellen nachweisbar [28].

Ablauf der  
Transplantationsvaskulopathie  
modifiziert nach  
Expert Reviews  
in Molecular Medicine  
2003 Cambridge University Press

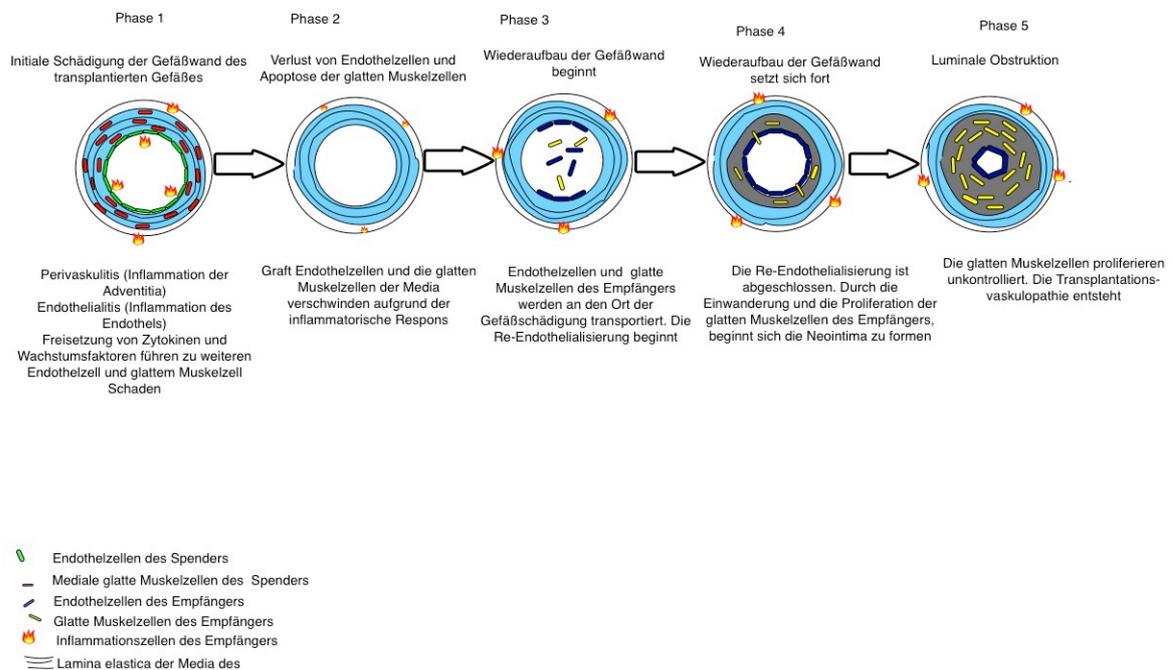


Abbildung 1: Ablauf der Transplantationsvaskulopathie Modifiziert nach Hillebrands et al. [38]

## 1.7 Herkunft der glatten Muskelzellen der Neointima

Nach neueren Erkenntnissen entsteht die Neointima durch Zellen des Transplantatempfängers. So konnte bei einem Ratten-Aortenmodell mit Hilfe der MHC1- Färbung gezeigt werden, dass die Neointima-Endothelzellen nach sechs bis acht Wochen eindeutig vom Empfänger stammten. Der Anteil von aus dem

Knochenmark stammenden Endothelzellen war in dieser Arbeit mit 1-3% nur marginal [39].

Da die SMCs nicht vom Spender, sondern vom Empfänger ausgehen und auch nicht aus benachbarten Empfängergefäßen stammen, wird davon ausgegangen, dass sie das Spenderorgan aus dem Blutstrom erreichen [27]. Herauszufinden, woher diese Zellen stammen, ist wichtig für spätere Therapieansätze. Wenn die SMCs z.B. aufgrund von Mechanismen, die der Rekrutierung von Entzündungszellen gleichen einwandern [40], dann könnten an diesem Vorgang spezifische Chemokine und Adhäsionsmoleküle beteiligt sein, welche wiederum einen Ansatz für Therapiestrategien bieten könnten. Die ersten Alpha-Aktin-positiven-Zellen des Empfängers, die in die Neointima einwandern, sind luminal lokalisiert [27]. Dies beweist nicht, dass die Zellen direkt aus dem Lumen einwandern, könnte aber ein Hinweis darauf sein, dass eine schnelle Transmigration in die neu geformte Intima stattfindet [27]. Dies würde bedeuten, dass Barrieren wie die interne und externe Lamina und die extrazelluläre Matrix umgangen würden. Obwohl die Laminae fenestriert sind und eine mediale extrazelluläre Matrix sehr porös ist, wäre die vaskuläre Transmigration verzögert [27] und somit der luminaire Weg der schnellere und wahrscheinlichere. Auch ist interessant, dass bei koronar venösen Bypass-Operationen die Neointima-Formation erst nach dem Verlust des Endothels beginnt und zeitnah gefolgt wird von der Rekrutierung von SMLC precursor cells (glatten Muskelzellen ähnelnde Vorläuferzellen) am Ort der Endothelschädigung [41]. Der Verlust des Endothels könnte also einen wichtigen ersten Schritt für die luminaire Bindung von SMLC precursor cells darstellen [27]. Diesem Prozess scheint eine vermehrte Adhäsion von Thrombozyten vorherzugehen, welche durchaus in Verbindung mit Scherkräften wie z.B. bei Verletzung einer Arterie auftreten können [27]. Dass Plättchen-Aktivierung mit der Entwicklung von Transplantationsvaskulopathie in Verbindung steht, ist bereits beschrieben worden [42]. Falls die luminaire Adhäsion von SMLCs auf diesem Weg erfolgt, könnte eine Hemmung der Thrombusbildung und der Plättchen-Adhäsion einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz zur Verhinderung der Transplantationsvaskulopathie darstellen [43].

Einen alternativen Ansatz legt De Geest vor. In seinem Leitartikel über die Herkunft von glatten Muskelzellen in der Intima beschreibt er, dass SMC der Intima eingewanderte SMC der Media sind. Darüber hinaus können Progenitor-Zellen eine lokale Quelle darstellen. Das Vorhandensein von Progenitor-Zellen im Blut ist bekannt, aber ob sich

diese zu SMC differenzieren, ist nicht sicher. Dies hängt von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, ECM Proteinen und mechanischen Kräften ab [44].

Ziel einer weiteren Studie von Rodriguez-Menocal et al. war es, mit Hilfe eines Ratten-Ballon-Models und arteriellem Transplantationsmodels den Ursprung von „Post Injury Neointima Cells“ zu finden. Knochenmarkzellen wurden gefärbt mit „green fluorescent protein“ (GFP). Es zeigte sich, dass die meisten Neointima-Zellen von bereits existierenden Gefäßzellen stammten. Diese Zellen veränderten sich von einem kontraktiven Typ in der Media zu einem synthetischen Typ und wanderten nach Verletzung des Gefäßes durch die Gefäßwand ein und bildeten die Neointima [45].

## **1.8 Stickstoffmonoxid (NO)**

Die Integrität des Gefäßes ist in besonderem Maße abhängig von der Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch unversehrte Endothelzellen. NO wurde ursprünglich „Endothelium Derived Relaxing Factor“ (EDRF) genannt [46]. Es handelt sich um ein pleiotropes Signalmolekül, welches an mehreren Prozessen beteiligt ist. So reguliert es z.B. den Vasotonus, kann aber auch nach Freisetzung aus dem Endothel die Plättchen- und Leukozytenaggregation hemmen, indem es die Freisetzung von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen hemmt [47]. NO ist der potenteste bekannte endogene Vasodilatator [48]. Die Vasodilatation geschieht hierbei durch Stimulation von löslicher Guanylat-Cyclase, die cGMP, den second messenger von NO, produziert [49]. cGMP inhibiert den Calciumeinstrom in die Zelle und vermindert dadurch die intrazelluläre Calciumkonzentration. Auch die durch NO aktivierten Kalium-Kanäle führen zu einer Hyperpolarisation und Relaxation des Gefäßes. NO kann möglicherweise auch Apoptose zumindest *in vitro* in SMC generieren [50].

## **1.9 Stickstoffmonoxid Synthasen (NOS) und deren Einfluss auf Gefäße**

Es existieren drei wichtige enzymatische Quellen für die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin, sogenannte Synthasen.

Es handelt sich hierbei um die endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase (endothelial Nitric Oxide Synthase, eNOS, NOS3), die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS, NOS2) und die neuronal Nitric Oxide Synthase

(nNOS, NOS1). Die drei Synthesen sind in verschiedenen Schichten der Arterienwand zu finden: eNOS in Endothelzellen der Intima und iNOS in den glatten Muskelzellen sowie in Entzündungszellen [51] der Media; nNOS findet sich nach Gefäßschädigung hauptsächlich in in glatten Muskelzellen der Neointima [52].

### **1.9.1 eNOS**

Bei eNOS handelt es sich um eine von Endothelzellen gebildete Synthase, die durch Calcium/Calmodulin kontrolliert wird. eNOS findet sich darüber hinaus in Kardiomyozyten [53], Lungenepithel [54]- und Pyramidalzellen im Hippocampus [55].

Von eNOS stammendes NO ist der potenteste endogene Vasodilatator [48]. Durch eNOS gebildetes NO inhibiert die Adhäsion von Plättchen und Leukozyten an der Gefäßwand [56, 57]. Darüberhinaus inhibiert von eNOS stammendes NO die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen [58]. Bei einer Schädigung des Endothels kommt zu einer Beeinträchtigung der Endothel-vermittelten Vasodilation, erhöhten vaskulären Reaktivität, Plättchen-Aktivierung, Thrombus-Formation, erhöhten Permeabilität, Leukozytenadhäsion und Monozyten-Einwanderung in die Gefäßwand [59]. Mäuse, bei denen das eNOS-Gen ausgeschaltet ist, entwickeln einen erhöhten Blutdruck [60].

### **1.9.2 iNOS**

Die induzierbare NO-Synthase iNOS wird durch Inflammation in glatten Gefäßmuskelzellen und Entzündungszellen in Gang gesetzt. Dies kann eine Überproduktion von NO zur Folge haben [51]. Bei eNOS wie bei iNOS geht das Ausschalten der jeweiligen Genexpression mit einer erhöhten Neointimaproliferation einher [30, 50]. iNOS ist assoziiert mit massivem Blutdruckabfall und einem negativ inotropen Effekt auf Kardiomyozyten [46]. iNOS wird nicht durch Calcium beeinflusst, vermutlich auf Grund der engen non-kovalenten Calmodulin- und Calcium-Interaktion.

iNOS-Expression und der damit verbundene hohe NO-Ausstoß ist verbunden mit systemischer Hypotension, inadäquater Gewebepfusion und Organversagen. Dieser Zustand ist mit dem des septischen Schocks vergleichbar [61]. Dabei wird erst eNOS aktiviert, wobei das hierdurch entstandene NO die iNOS-Expression kostimuliert [61]. Die normale iNOS-Expression ist unabdingbar, um bakterielle Infektionen zu

bekämpfen; eine Überproduktion von NO allerdings kann zu kardiovaskulärer Dysfunktion führen [61]. Eine herabgesetzte iNOS-Expression geht mit einer stabileren Hämodynamik einher [61].

### **1.9.3 nNOS**

Die dritte NO-Synthase ist die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase nNOS. Der Name ist historisch bedingt, denn in jüngster Zeit konnte nNOS auch in nicht-neuronalem Gewebe nachgewiesen werden. Der funktionelle Einfluss auf das Gefäßremodelling und ein hemmender Einfluss auf die Entwicklung vaskulärer Läsionen konnte in vivo gezeigt werden [52]. In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass nNOS bei eNOS defizienten Mäusen hochreguliert war und dadurch den Koronarfluss aufrecht erhalten konnte [62].

Das genaue Zusammenspiel der einzelnen NOS-Isoformen wird weiterhin erforscht [63].

## 2 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde untersucht, wie die einzelnen NOS-Isoformen in einem in vivo Transplantationsmodell interagieren und welchen Einfluss sie auf die Transplantationsvaskulopathie ausüben. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf nNOS gelegt, welches bis jetzt in den meisten Studien nur wenig Beachtung fand. Als Modell diente ein etabliertes histoinkompatibles Mausmodell.

Methodisch sollte die Expression unterschiedlicher Gene und Moleküle in eNOS Knockout Mäusen und entsprechenden Kontrolltieren ohne Knockout nach Gefäßtransplantation untersucht werden.

Die Aorta thoracalis wurde BALB/c Spendermäusen entnommen und in zwei Gruppen von Empfängern in die rechte Arteria carotis eingepflanzt. Das transplantierte Gefäß wurde mit Hilfe eines Cuffs in die Empfängermaus eingesetzt.

Eine Empfängergruppe bestand aus eNOS defizienten C57BL/6J (H-2b) Mäusen, die andere aus einer C57BL/6J (H-2b) Kontrollgruppe (Wildtyp). Die Mäuse wurden nach 4 Wochen getötet und die transplantierten Gefäße entnommen, um histologisch, immunohistochemisch und mit Hilfe der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) untersucht zu werden. Die histologischen Untersuchungen dienten der Beurteilung von Intima, Media, Lumen und der Intima/Media Ratio, um die Ausbildung der Neointima und das Ausmaß der Lumeneinengung zu beurteilen. Immunohistochemisch wurden Alpha-Aktin-positive Zellen quantifiziert, die bei der Neointima-Bildung einwandern, sowie das vaskuläre Adhäsionsmolekül VCAM (vascular cell adhesion molecule), Makrophagen (F4-80), und CD8/CD4-positive T-Lymphozyten. Um das Vorhandensein von NO nachzuweisen, wurde cGMP als second Messenger des NO gefärbt. Die einzelnen NOS-Isoformen wurden durch PCR untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die folgenden Fragen zu beantworten:

1. Gibt es hinsichtlich der Neointima Bildung einen Unterschied zwischen eNOS Knockout -Mäusen und der Wildtyp Kontrollgruppe?
2. Wie verhalten sich die an der Neointimabildung beteiligten entzündlichen Prozesse und die glatten Muskelzellen in der eNOS Knockoutgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe?

3. Wie verhalten sich iNOS und nNOS, wenn eNOS ausgeschaltet ist, und welche Konsequenz hat die NOS-Interaktion auf die Neointimabildung?
4. Gehen die an der Neointima beteiligten Prozesse vom Spender oder Empfänger aus?
5. Inwieweit könnten die Ergebnisse von klinischer Relevanz sein?

### 3 Materialien

#### 3.1 Antikörper

Tabelle 2: Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Monoclonal Anti-alpha smooth muscle actin 1A4 Mouse ascites fluid	1:20.000	Sigma Aldrich
PECAM-1 (M-20) : sc-1506	1:50	Santa Cruz
VCAM-1 (H-276):sc 8304	1:100	Santa Cruz
CD3	1:50	AbD Serotec Düsseldorf
CD4 (C-18): sc-1140	1:50	Santa Cruz
CD8-alpha (D-9): sc-79 70	1:100	Santa Cruz
cGMP sheep	1:50	Schenkung von Dr. de Vente University of Maastricht
antibody against mouse H- 2Kb	1:50	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
nNOS Rabbit pAb	1:50	BD Biosciences,
eNOS Rabbit pAb	1:50	BD Biosciences
iNOS Rabbit pAb	1:50	BD Biosciences

## 3.2 Puffer und Lösungen

Tris-buffered saline (TBS)

Citrat Puffer

EDTA

## 3.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien und Reagenzien

Name	Katalog/Bestellnummer
Serva Tween 20	Cat Nr 37470
Tri- Natrium-Dihydrat Merck	Cat Nr. 1.06448.1000
Natronlauge Merck	1.09913.0001
Salzsäure Merck	1.09063.1000
Peroxidase Blocking Reagent Ready to use Dako Cytomation	S 2001
Avidin Solution Dako Cytomation	X0590
Biotin Solution Dako Cytomation	X0590
AEC+Substrate Chromogen Ready to use Dako Cytomation	K3469
Polyclonal Rabbit Anti Mouse Immunoglobulins/HRP	
Dako Fast Red Substrate System	K0597
Goat Anti Rabbit IgG (H+L) Conjugate (Zymed)	81-6122
Mayers Hämalaulösung Merck	1.09249.0500
Eosin (Roth)	7089.1
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Merck	1.08387.2500

Natriumchlorid Merck	1.06404.1000
Essigsäure (Merck)	1.00063.2511

### 3.4 Geräte und Instrumente

Tabelle 4: Geräte und Instrumente

Zentrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Deutschland Hamburg, Deutschland
Combitips plus, 0.5/2.5/5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryo Tube™ Vials	NUNC™ Brand Products, Dänemark
Eppendorf tips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf tubes 0.5/1.5/2.0ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Exam Gloves	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Kapillaren	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Mikroskop	Zeiss Mikroskop Imager A.1 Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Microscope Slides, Super Frost Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Microscope Cover Glasses	Gerhard Menzel GmbH,

	Braunschweig, Deutschland
Minishaker MS1	IKA-WERKE GmbH, Staufen, Deutschland
Pipette 2, 5, and 25 ml	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
pH Meter	Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Single-use fine dosage syringe	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Sterile Syringe 1ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Kühlschrank	Bosch Deutschland
Chirurgisches Besteck	Medicalis Medizintechnologie, Garbsen, Deutschland
Software: axiovision 4.4	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

## **4 Methoden**

### **4.1 Tiermodell**

Die Mäuse der Donor Gruppe entstammten dem BALB/c (H2d) Stamm (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) die Empfänger-Kontrollgruppe-Mäuse (N=12) dem C57BL/6J Stamm (ebenfalls Charles River Laboratories) und die eNOS defizienten Mäuse (N=12) aus dem C57BL/6J (H-2b) Stamm (Jackson Laboratories Bar Harbor, ME). Der Tierversuch ist am 11.05.2005 unter der Aktennummer G 0219/05 genehmigt worden und das Ethikvotum lag vor.

#### **4.1.1 Transplantationsmodell**

Die Tiere wurden bei einer konstanten Außentemperatur von 24° Celsius gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Es erfolgte eine Teilung in eine Donorgruppen und zwei Empfängergruppen. Die Gefäßtransplantation erfolgte in Anlehnung an Dietrich et al. (65).

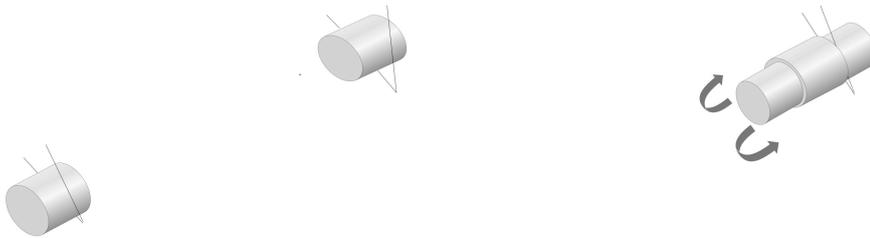
Den Mäusen wurde Pentobarbital Natrium (50mg/kg KG) und Heparin (100 U in 100 Mikrolitern Saliner Lösung) in die Vena cava inferior injiziert. Die Spendermäuse wurden betäubt und nach 3- minütiger Wartezeit operiert. Die Eröffnung des Thorax erfolgte mittels abdominalem Mittellinien-Schnitt und medianer Thorakotomie. Die Aorta thoracalis war somit freigelegt und konnte entfernt werden. Alle Spenderarterien wurden mit Natrium und Heparin (100U/mL) gespült.

Es folgte die Narkose der Empfängertiere. Die Fixierung der Mäuse fand in Rückenlage und mit überstrecktem Kopf statt. Um die rechte A. carotis communis vom distalen Ende her freizupräparieren, wurde auf der ventralen Seite des Halses, von der unteren Mandibel bis zum Sternum ein Mittellinienschnitt vollführt. Die Enden wurden mit 8-0 Seidenfaden ligiert und zerschnitten und jeweils durch eine Nylonröhre (Cuff) geführt. Die Länge des Cuffs betrug ca 1 mm plus eine 1 mm lange Extension, der Innendurchmesser 0,5 mm, der Aussendurchmesser 0,63 mm. Der Faden an beiden Arterienenden konnte dann entfernt und der überstehende Gefäßteil über den Cuff gestülpt werden. Dort wurde der überstehende Gefäßteil mit einem 8-0 Seidenfaden fixiert. Das von den Donor-Tieren entfernte Arteriensegment der A. thoracalis wurde im

Anschluss an den jeweiligen Enden über den Cuff gezogen und erneut mit einem 8-0 Faden fixiert Abb.2-5)

### Abbildung 2-5

schematische Darstellung der Gefäßtransplantation nach Dietrich et al [64]



#### Abbildung 2

Hier werden die beiden Arterienenden der A. carotis communis des Empfängertieres dargestellt.

#### Abbildung 3

Der Cuff wird über die jeweiligen Arterienenden gestülpt und danach mit Faden fixiert.



#### Abbildung 4

Das Spendergefäß wird über die Cuffs gezogen und dort wiederum mit Faden fixiert.

#### Abbildung 5

Die Klemmen werden entfernt und das transplantierte Gefäß wird nun durchblutet.

Nach 4 Wochen wurde das transplantierte Aortensegment aus den getöteten Tieren entfernt. Das Gefäß wurde durch Perfusion mit 4%iger Phosphat gepuffertem Formaldehyd fixiert, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Das Material für die Gefrierschnitte und die RNA Isolation wurde mit Hilfe von flüssigem Stickstoff

schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  konserviert. Die eNOS Defizienzüberprüfung fand mit Hilfe der RT-PCR (Reverse-Transkriptase Polymerase Chain Reaction) von Nieren- und Herzgewebe statt. Die mikroskopische Chirurgie wurde mit freundlicher Hilfe von Linghua Kong durchgeführt.

#### **4.1.2 Histologie**

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden aus dem paraffingebetteten Aorten-Gewebe  $5\ \mu\text{m}$  große Schnitte entnommen und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt; die Messungen und Untersuchungen mit einem Zeiss Mikroskop Imager A.1 und der Axio Vision 4.4 Software vorgenommen. Anschließend erfolgte das Einlesen und Vermessen der Gefäßschnitte über den Bildschirm, mit Hilfe eines speziellen elektronischen Pens, eines Stifts mit dem man die Konturen des jeweiligen Gefäßabschnittes markieren konnte, und eines mit dem Computer verbundenen Pads, einer speziell für den Pen gemachte Matte, die die vom Pen markierten Konturen erfasste und in den Computer einlas. Das Endothel, die Lamina elastica und die Lamina elastica externa wurden als natürliche Grenzen der Aortenabschnitte eingescannt. Um die Fläche der Intima zu berechnen wurde die Lumenfläche (vom Endothel definiert) von derjenigen Fläche, die von der Lamina elastica interna eingeschlossenen wurde subtrahiert. Die Media errechnete sich aus der Differenz der von der Lamina elastica interna begrenzten Fläche und der von der Lamina elastica externa begrenzten Fläche.

#### **4.1.3 Immunhistochemie**

Die immunohistologischen Färbungen erfolgten mit Hilfe der indirekten Immunperoxidasereaktion. Hierfür wurden die  $5\ \mu\text{m}$  dünne Schnitte in einer absteigenden Ethanolreihe entparaffiniert und rehydriert. Die Antigendemaskierung fand in Citrat Puffer in einer Mikrowelle statt. Die endogene Peroxidase wurde mit dem Peroxidase Blocker (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) geblockt. Nach Auftragen des ersten Antikörpers in der durch Vorversuche ermittelten Konzentration wurden die Schnitte inkubiert.

Im Anschluss wurde die Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Antikörper(Dako Cytomation) als zweiten Antikörper aufgetragen. Zur Visualisierung wurde AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazole) und Substrat Chromogen (Dako Cytomation) verwendet, deren Farbumschlag durch enzymatische Reaktion mit den HRP konjugierten

Sekundärantikörpern stattfand. Für die Gesamt-NOS-Färbungen (BD Transduction Laboratories) war eine Verdünnung von 1: 100 notwendig. Als Sekundärantikörper wurde Alkaline Phosphate Conjugate verwendet. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten und die Spülung mit Puffer. Die Anfärbung der Antigene erfolgte mit Fast Red Substrate (Dako Cytomation). Die Entwicklungszeit betrug jeweils zwischen 2 und 20 Minuten. Zum Gegenfärben benutzten wir Hämalaun nach Mayer, in das die Objekte für einige Sekunden getaucht wurden. Darauffolgend bläuten die Objektträger 5 bzw. 3 Minuten unter warmem Leitungswasser. Abschließend wurden die Objektträger mit Abdeckgläsern belegt. Die

H-2Kb Färbung wurde mit Azeton-fixierten 5 Mikrometer Gefrierschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden mit einem biotinylierten monoklonalen Maus-Antikörper (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) bei einer Verdünnung von 1:50 inkubiert. Darauf folgte die Behandlung mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase und der Färbung mit Hilfe von AEC Substrat (DAKO Cytomation). Diese Färbung wurde mit Hilfe von Uwe Hoff erstellt.

Die Auswertungen fanden mit Hilfe des Zeiss Axiom Imager A1 Lichtmikroskops statt. Hierzu wurde die positiv gefärbte Fläche markiert, die dann mit einem 10 x 10 Flächenraster überlagert wurde. Für alle Messungen wurde jede Sektion doppelt von zwei unterschiedlichen Untersuchern ausgewertet. Abschließend wurden die Präparate mit Hilfe der Image Analysis Software untersucht. Die Analyse geschah anhand von drei bis sechs Schnitten pro Tier und sechs Schnitten pro Gruppe. Um den Durchschnittswert zu errechnen, führten wir acht Messungen pro Schnitt für die Berechnung der Neointima mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin Färbung und mindestens zwei Messungen pro Schnitt für die Immunohistochemischen Schnitte durch. Für die H-2Kb Färbungen verwendeten wir 5 µm dünne Azeton-fixierte Gefrierschnitte. Die Schnitte wurden mit biotinyliertem Monoklonalen Antikörper gegen Mäuse H-2Kb (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) mit einer Verdünnung von 1: 50 inkubiert. Daraufhin folgte die Behandlung mit Streptavidin-Horseradish Peroxidase (Dako Cytomation) und Anfärbung der Antigene mit AEC+Substrate Chromogen (Dako Cytomation).

Der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Fläche pro Arterie wurde vom Programm berechnet.

Die Zählung der positiv gefärbten Zellen erfolgte manuell.

## **4.2 Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe von Trizol Reagenz (Invitrogen life technologies, Karlsruhe, Germany) aus gefrorenem Material und die Reverse Transkription mit Hilfe des Omniscript RT Kits (Qiagen, Hilden, Germany) nach Herstellerangaben. Die Sequenzen für die PCR Primer, die TaqMan Sonde, die GenBank Accession Nummer und die PCR Einstellungen können der Tabelle 1 entnommen werden. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) diente als interne Kontrolle. Die Verstärkung spezifischer PCR-Produkte geschah mit Hilfe von TaqMan Sonden die mit 6-carboxyfluorescein (FAM) am 5' Ende, und mit 6-carboxytetramethylrhodamin (TMR) oder Phosphat (PH) oder BBQ dark quencher (TIB MOLBIOL, Germany) am 3' Ende gelabelt waren. Die Real-time PCR erfolgte mit Hilfe des ABI Prisma 7000 Sequentes Detection Systems (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) in 96-well Mikrotiterplatten, die ein Endvolumen von 25 µl besaßen und jeweils 400 Nanomolar des Primers enthielten. Darüber hinaus 200 Nanomolar TaqMan-Sonden, 1xTaqMan universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, New Jersey, USA) und 1 µl einer 2 Mikrogramm Matrize cDNA. Signalverstärkungen wurde anfangs mit einem 10-minütigem Denaturierungsschritt bei 95°C durchgeführt gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 95°C und einer Dauer von 15 Sekunden samt kombinierter Primer Annäherung/Extension an der genspezifischen Primertemperatur bei eine Dauer von 1 Minute (siehe Tabelle 1). Die Messung des Fluoreszenzanstieg der FAM geschah automatisch während der PCR. Alle wurden dreifach verstärkt und der Durchschnittswert durch weitere Berechnung ermittelt. Das relative mRNA Expressions-Level der Zielgene ließ sich mit Hilfe der komparativen Zykluszeit (C<sub>t</sub>)-Methode und des relativen mRNA Expressionslevels zur HPRT der jeweiligen Ziel-PCR mit folgender Formel errechnen: Relative mRNA-Expression =  $2^{-(C_t \text{ target} - C_t \text{ HPRT})} \times 100\%$  .

Mit Hilfe der PCR-Analyse konnte folgende Proteine nachweisen: eNOS, iNOS und nNOS. Die PCR Analyse wurde mit Hilfe von Kerstin Sommer durchgeführt.

**Tabelle 5: Primer und Sonden der quantitativen Echtzeit PCR**

Gene	Oligo	Sequence (5'-3')	Tm
iNOS	s	CTCggAggTTCACCTCACTgT	60°C
	as	TCCTgATCCAAGTgCTgCAGA	
	TM	<b>F-CACCTACCgCACCCgAgATgg-TMR</b>	
eNOS	s	CTggCagCCCCAAgACCTA	60°C
	as	gTgACATCgCCgCAGACAA	
	TM	<b>F-TCCTgAggACAgAgCTAgCCgCggAXT-PH</b>	
nNOS	s	CAGgTggACAgAgACCTCgAC	60°C
	as	CgggAgACTgTTCgTTCTCTgA	
	TM	<b>F-TTgTTgAggACCACAgggACgTTgC-BBQ</b>	
CD8	s	gACgAAgCTgACTgTggTTgAT	60°C
	as	gTCAGgCCCTTCTgggTCTC	
	TM	<b>F-AAgCAATgCCCGTTCCCCACCC-BBQ</b>	
Mac-1	s	AgTTCCCAGAggCTCTCAgAgAAT	60°C
	as	TCACAgTTgAgACAAACTCCTTCATCT	
	TM	<b>F-CTTCTTgATTgATggCTCCgTAgCATC-BBQ</b>	
VCAM-1	s	AAATgTgCCCGAAACATggATA	60°C
	as	ggCgAAAAATAgTCCTTgTTATgTTC	
	TM	<b>F-CCTgAAgAAgAAAgCAAAGACAggAgACA-TMR</b>	
PCAM-1	s	CCAgTAGCATCATggTCAACATAAC	60°C
	as	TACAggTgTgCCCGAgACg	
	TM	<b>F-AgCAGgACAggTCCAACAACCTCCCC-TMR</b>	
HPRT	s	TTATCAGACTgAAgAgCTACTgTAATgATC	60°C
	as	TTACCAgTgTCAATTATATCTTCAACAATC	
	TM	<b>F-TgAgAgATCATCTCCACCAATAACTTTTATgTCCC-TMR</b>	

Tm, melting temperature; s, sense primer; as, antisense primer; **F**, FAM label.

### 4.3 Statistische Methoden

Sämtliche Daten wie Flächen der einzelne Arterienanteile, prozentuale Anteile von positiv gefärbten Arealen der einzelnen Arterienabschnitte, Zellzählung, sowie Expression in der PCR wurden statistischen Analysen unterzogen. Mittelwerte und Standardfehler wurden mit Hilfe von Excel 2003 ermittelt.

Die Auswertung der immunohistochemischen Färbungen, die Auswertung der HE-Färbungen, sowie die Fotodokumentation geschah mit Hilfe von Axio Vision 4.4. Die

Werte sind als Mittelwert plus/minus Standardabweichung dargestellt. Der Vergleich unter den Gruppen erfolgte durch den Mann-Whitney-Test. P-Werte mit einem Wert unter 0,05 wurden als signifikant definiert.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Morphometrie und Neointima Bildung

#### 5.1.1 HE Färbung

Wie in 4.1.1 beschrieben wurden die Tiere nach 4 Wochen (28 Tagen) getötet, und die transplantierten Aorten entnommen. Die erste Betrachtung und Auswertung erfolgte mit Hilfe der HE-Färbung. Dabei zeigten die Kontroll-Mäuse eine weitaus ausgeprägtere Neointimabildung als die eNOS Knockout-Mäuse. Die Neointima stellte sich als erhebliche Verdickung der Intima mit einem entsprechend höherem Verhältnis von Intima zur Media (Intima/Media-Ratio) dar siehe Abb. 6 B. Hierdurch verschmälerte sich das Lumen deutlich. Die Intimadicke in den Aorten der eNOS Knockout Mäuse betrug lediglich etwa 42% ( $p < 0,01$ ), die Fläche von Intima plus Media 23% ( $p < 0,01$ ) und die Intima/Media-Ratio 40% ( $p < 0,01$ ) gegenüber derjenigen der Kontrollmäuse. Die Lumenfläche hingegen war um 90% ( $p < 0,01$ ) vergrößert.

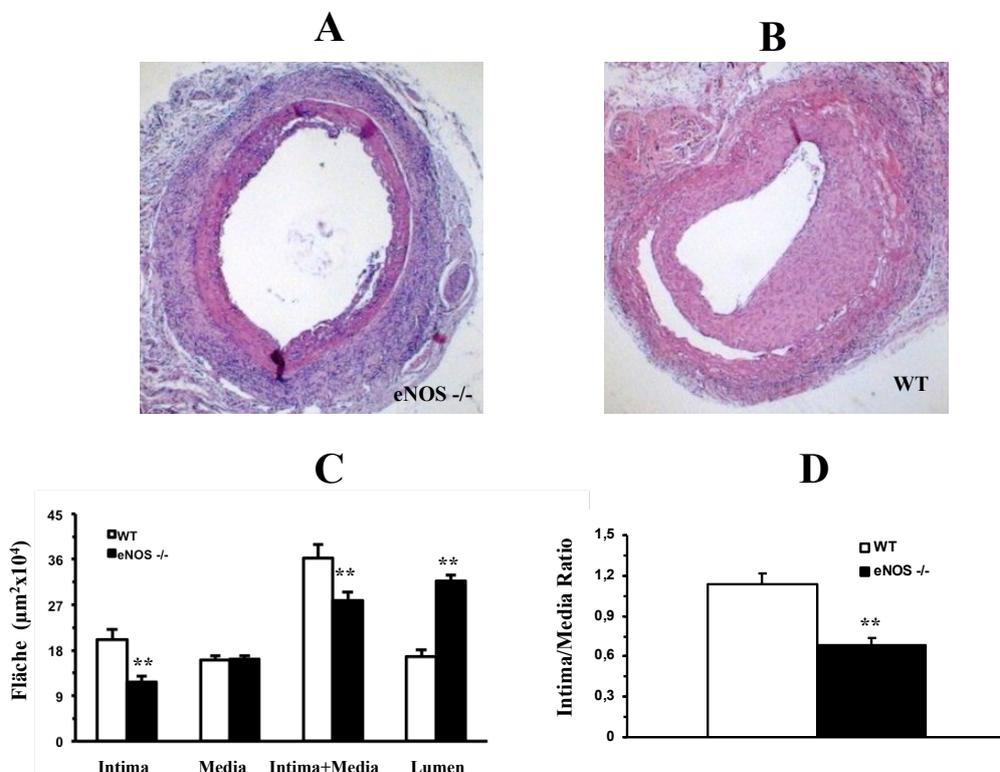


Abbildung 2: HE Färbung

Quantifizierung der Neointimabildung in den eNOS-defizienten Mäusen (eNOS<sup>-/-</sup>) und den Wildtyp Mäusen. Die von BALB/c Mäusen entnommene Aorten wurden in die beiden Empfängergruppen C57BL/6J (Wildtyp) und C57BL/6J (eNOS Knockout-Mäuse) transplantiert und nach 28 Tagen entnommen. A und B sind repräsentative Hematoxylin und Eosin Färbungen der entnommenen Gefäße in 100 facher Vergrößerung. Die Fläche der Neointima der Knockout-Mäuse (A) war im Gegensatz zu der Neointima der Kontrollmäuse (B) deutlich geringer. In den Balkendiagrammen C und D wurde die Dicke der Intima und Media samt Lumen und Verhältnis von Intima zu Media mit Hilfe einer semi-automatischen Bildanalyse Software errechnet. Die schwarzen Balken repräsentieren die Knockout- Mäuse und die weißen die Wildtyp- Mäuse. Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Im Vergleich zu den WT Mäusen war die Dicke der Intima der eNOS Knockout-Mäusen mit ca. 42% reduziert. Die Fläche von Intima und Media zusammen war in den Knockout-Mäusen mit ca. 23% reduziert. Das Lumen der K.O. war 90% grösser als das Lumen der Wildtyp Mäuse. Das Verhältnis von Intima zur Media war in der eNOS K.O.-Gruppe um 40% reduziert (D). (\*\*P< 0,01).

## 5.2 Alpha-Aktin-positive glatte Muskelzellen

Da bereits in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass die Neointimabildung durch die Beteiligung von Alpha-Aktin positiven Zellen vom VSMC Phänotyp erfolgt, verwendeten wir diese in unserem Experiment. Nach immunohistochemischer Färbung und Auswertung zeigte sich, dass die Fläche von Alpha-Aktin-positiven Zellen in der Intima der eNOS Knockout-Mäuse deutlich geringer war als in den Kontrollmäusen (ca. 75%,  $p < 0,01$ ). In der Media hingegen zeigte sich der Unterschied mit nur 25% ( $p < 0,05$ ) deutlich geringer. Dieses Ergebnis stimmt mit dem geringeren Ausmaß an Proliferation in den Knockout-Mäusen überein. Darüber hinaus fiel auf, dass eine dünne Schicht Alpha-Aktin-positiver Zellen in der luminalen Seite nur bei eNOS <sup>-/-</sup> Mäusen zu finden war. In der Media war die Färbung nur sehr schwach ausgeprägt. Bei den Kontrollmäusen zeigten sich die Alpha- Aktin-positiven Zellen diffus in der gesamten Intima verteilt. Die dünne Schicht positiver Zellen im Endothel fehlte hier. Die Media in der Kontrollgruppe war ebenfalls nur schwach angefärbt.

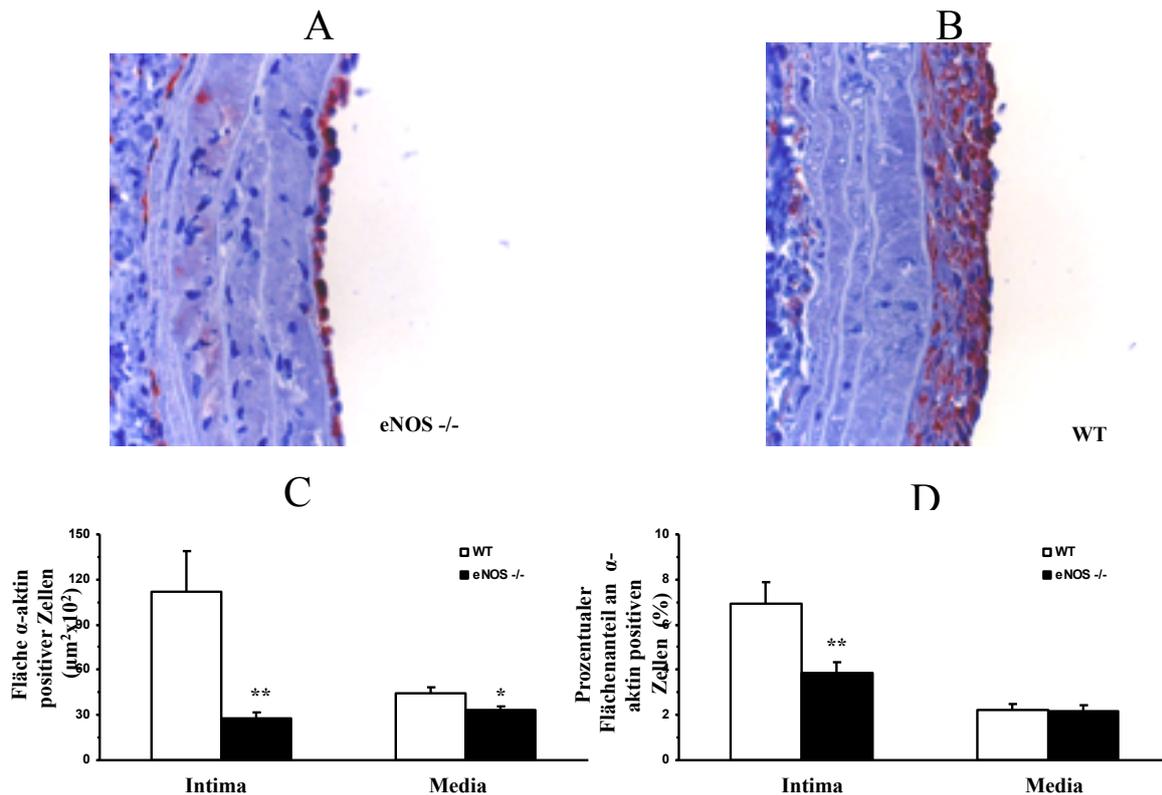


Abbildung 3: Alpha-Aktin-positive glatte Muskelzellen

Repräsentative Ausschnitte aus den in die beiden Mausgruppen transplantierten Gefäßen nach 4 Wochen bei 400 facher Vergrößerung. Die Ansammlung Alpha-Aktin-positiv gefärbter Zellen in der Intima ist deutlich reduziert in der eNOS Knockout-Gruppe (A) im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen (B). In der Media ist der Unterschied zwischen den beiden Gruppen deutlich weniger ausgeprägt. Diagramm C zeigt die absolute Fläche Alpha-Aktin-positiver Zellen in der Intima und in der Media. In der Intima war dieser 75% geringer in den Knockout-Mäusen ( $p < 0,01$ ) als in den Wildtyp Mäusen und in der Media 25% geringer ( $p < 0,05$ ). Diagramm D zeigt den prozentualen Flächenanteil Alpha-Aktin-positiv gefärbter Zellen. Hier ist der Unterschied nur in der Intima signifikant. (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

### 5.3 Nachweis von Adhäsionsmolekülen

Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, wie VCAM-1 oder PECAM-1, ist Ausdruck der Frühphase einer Transplantatabstoßung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass beide Adhäsionsmoleküle (VCAM-1 und PECAM-1) im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Intima der eNOS -/- Mäusen deutlich verringert waren. Die für das Adhäsionsmolekül VCAM-1 positiv gefärbte Fläche war in der Intima der eNOS -/- Mäuse um 97% ( $p < 0,01$ ) geringer als bei den Kontrollmäusen. Innerhalb der Media der Kontrollmäuse ließ sich VCAM-1 kaum nachweisen, bei den eNOS -/- Mäusen hingegen fehlte es gänzlich. Hinsichtlich des PECAM-1-Adhäsionsmoleküls verhielt sich dies ähnlich. Hier war das Areal für PECAM-1 positiv gefärbte Zellen in der Intima um 88% ( $p < 0,05$ ) reduziert. Darüber hinaus zeigte sich auch hier ein Unterschied

in der Media: Das Areal für PECAM-1 positiv gefärbte Zellen war 88% ( $p < 0,05$ ) geringer in den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen als in der Kontrollgruppe.

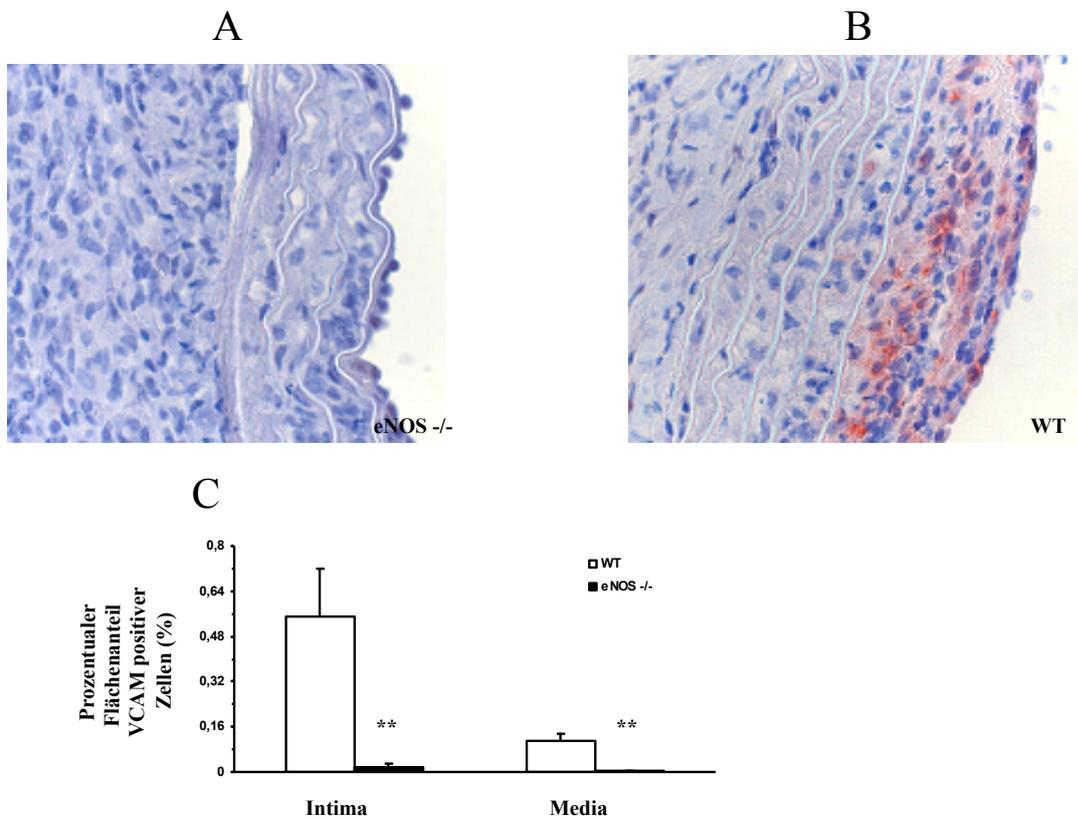


Abbildung 4: Nachweis von Adhäsionsmolekülen (VCAM)

Repräsentative Gefäßausschnitte des Transplantats in den beiden Empfängergruppen nach 4 Wochen in 400 facher Vergrößerung. Deutlich sichtbar ist das Farbsignal für VCAM positiv gefärbte -Zellen fast nur in der Kontrollgruppe (B) und weitaus prominenter in der Intima als in der Media. Das Farbsignal in den Knockout-Mäusen (A) ist kaum zu sehen. Diagramm C zeigt einen signifikanten Unterschied in der Media sowie in der Intima, mit mehr prozentualen Flächenanteil von positiv gefärbten VCAM Zellen in den Wildtyp Mäusen (\*\* $p < 0,01$ ).

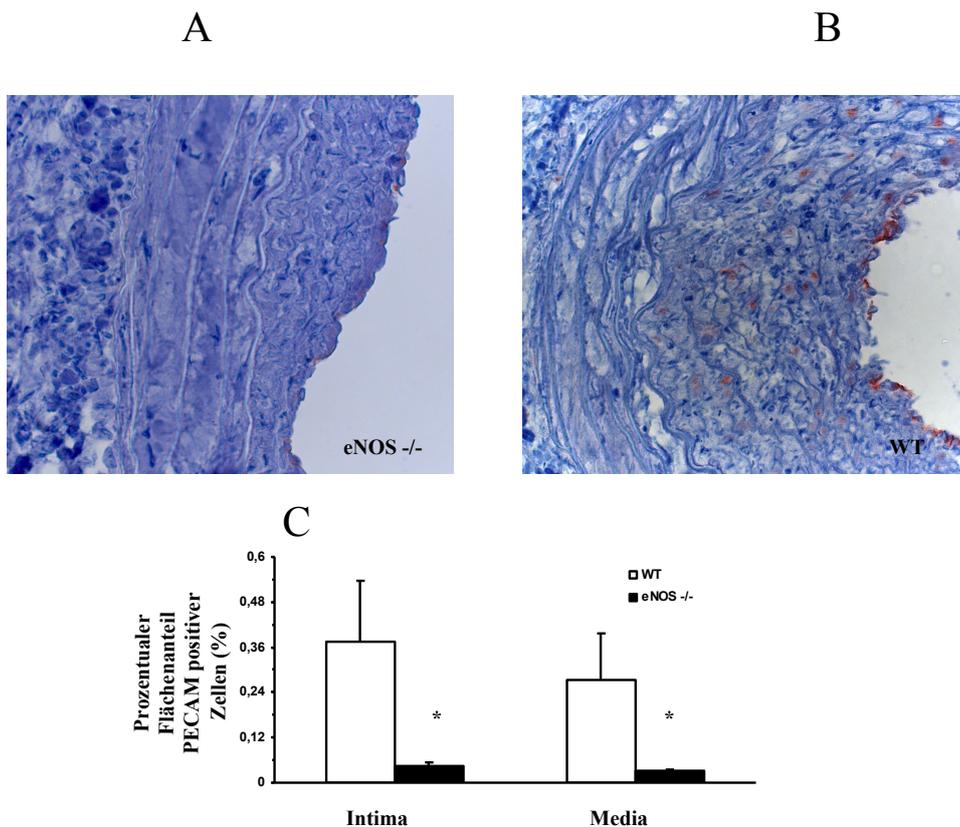


Abbildung 5: Nachweis von Adhäsionsmolekülen (PECAM)

Repräsentative Gefäßausschnitte des Transplantats in den beiden Empfängergruppen nach 4 Wochen in 400 facher Vergrößerung. Das Farbsignal für PECAM positiv gefärbte -Zellen ist eindeutiger in den der Wildtyp Mäuse als in den Knockout-Mäusen und etwas stärker in der Intima als in der Media ausgeprägt. Diagramm C zeigt den signifikanten Unterschied im prozentualen Anteil positiv gefärbter Zellen in Intima und Media ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Nachweis von Lymphozyten (CD3, CD4 und CD8)

Die Beurteilung der zellulären Abstoßung wurde durch die Untersuchung der Einwanderung von Lymphozyten und Makrophagen in die transplantierten Aorten vorgenommen.

Die CD3 positiv gefärbten Zellen waren in der Intima und Media der Kontrollmäuse deutlich nachweisbar. In den Knockout-Mäusen hingegen fehlten sie fast vollständig.

Ähnliches galt für die CD4 Färbungen: Positiv gefärbte Zellen waren in der Intima und Media der Kontrollmäuse vorhanden und in den eNOS -/- Mäusen reduziert. Der Unterschied hier war allerdings nicht signifikant.

Für CD8 hingegen galt – wie für CD-3 – eine signifikante Zellzahlreduktion der positiv gefärbten Zellen in der Intima um 63% ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Media hingegen war der Unterschied nicht signifikant.

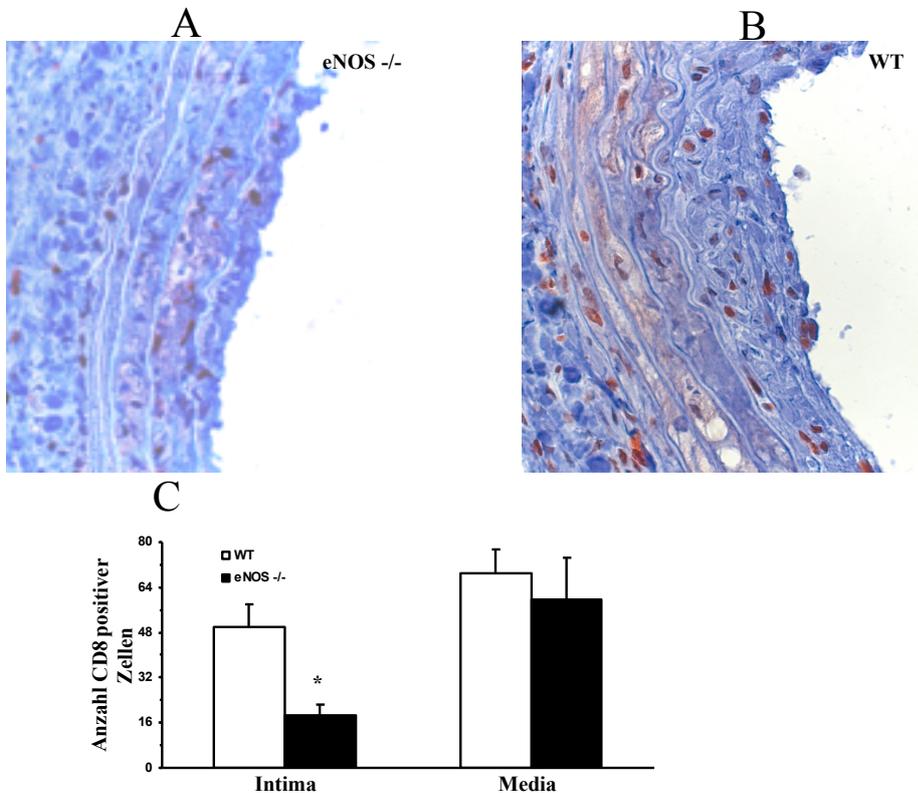


Abbildung 6: Nachweis von Lymphozyten CD8

CD8 gefärbte Gefäßauschnitte der transplantierten Gefäße in den beiden Empfängergruppen nach 4 Wochen. Die Verteilung der positiv gefärbten Zellen ist bei dieser Abbildung diffus über Intima, Media und auch Adventitia verteilt. Die Intima in der Wildtyp Gruppe (B) ist deutlicher ausgebildet als in der Knockout-Gruppe (A). Der Unterschied in der Anzahl CD8 positiver ( Diagramm C) war nur für die Intima signifikant. Auch hier waren mehr Zellen in der Wildtyp Gruppe vorhanden als in der Knockout-Gruppe.

## 5.5 Nachweis von Makrophagen durch F4-80

Für den Nachweis von Makrophagen verwendeten wir als Marker F4-80. Die Anzahl der Makrophagen war in der Intima der Knockout-Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 82% ( $p < 0,05$ ) reduziert. Für die Media hingegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

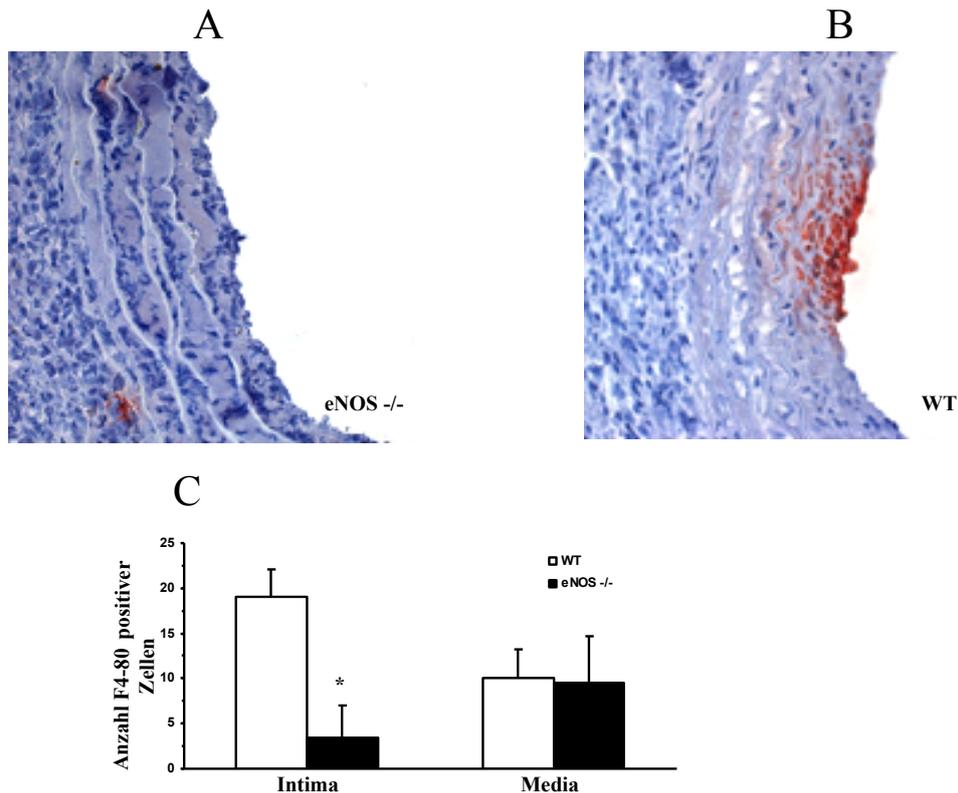
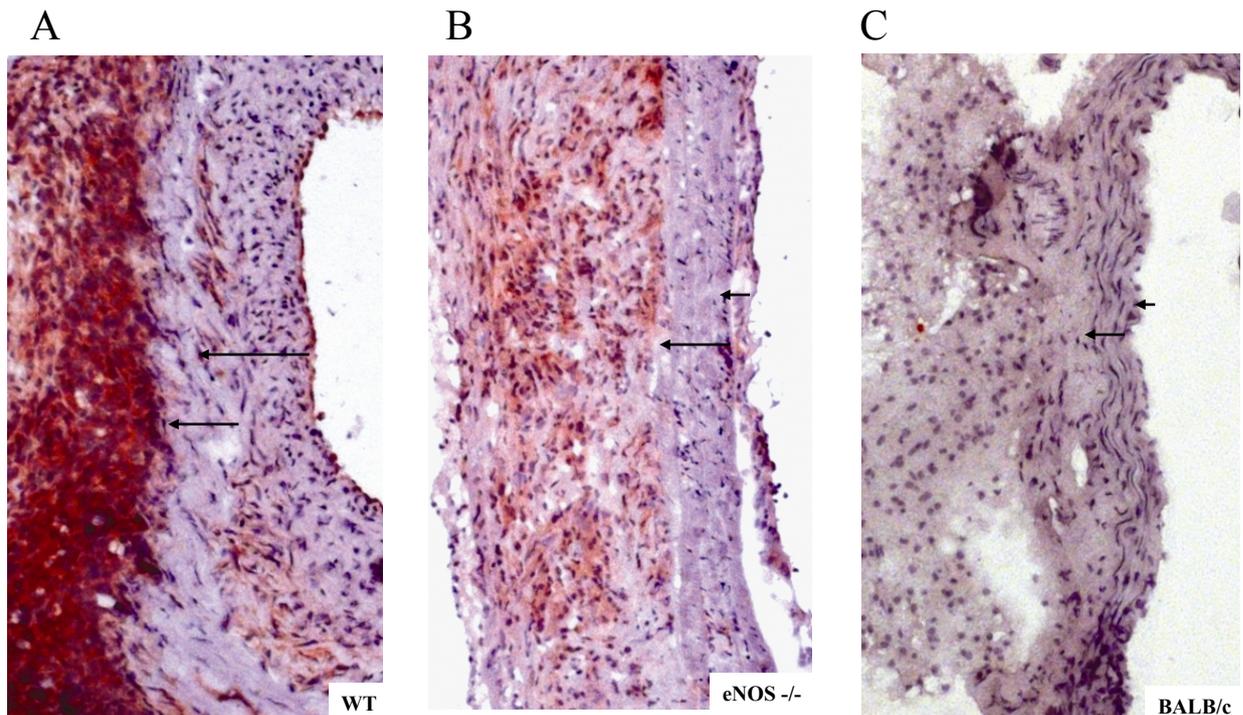


Abbildung 7: Nachweis von Makrophagen durch F4-80

F4-80 Färbungen der transplantierten Gefäße nach 4 Wochen in den beiden Empfängergruppen bei 200 facher Vergrößerung. Die F4-80 positiv gefärbten Zellen befinden sich hauptsächlich in der Intima der Wildtyp Mäuse (B). In der Media der Wildtyp Mäuse sind sie auch vorhanden, doch weniger zahlreich. Im Gegensatz dazu sind die positiv gefärbten Zellen bei den Knockout-Mäusen (A) spärlicher gesät. Allerdings befinden sich mehr gefärbte Zellen in der Media als in der Intima. In Diagramm C sieht man den signifikanten Unterschied für die Anzahl F4-80 positive Zellen in der Intima. Der Unterschied zwischen der Media der Knockout-Mäuse und der Media der Wildtyp Mäuse war nicht signifikant.

## 5.6 Nachweis der Herkunft der eingewanderten Zellen durch H-2Kb

Um die Herkunft der eingewanderten Zellen im Transplantat zu bestimmen, verwendeten wir als Nachweis das murine Histokompatibilitätsantigen H-2Kb, welches spezifisch für Zellen des C57BL/6 Stammes, also des Empfängerstammes ist. Während in der Neointima der Kontrollgruppe eine positive Zellfärbungen nach 28 Tagen nachweisbar war, zeigte sich die Neointima-Färbung der eNOS -/- Mäuse deutlich vermindert. H-2Kb positive Zellen waren in der Adventitia beider Gruppen vorhanden, allerdings mit deutlicherer Expression in der Kontrollgruppe. Eine Kontrollfärbung von Aorten der Spendertiere vom Stamm BALB/c zeigte keinerlei positive Zellen.



**Abbildung 8: Nachweis der Herkunft der eingewanderten Zellen durch H-2Kb**

Gefäßabschnitte von Wildtyp Mäusen (A) eNOS Knockout-Mäusen (B) und BALB/c Mäusen (C) als Kontrolle. Die Pfeile markieren interne und externe Lamina Elastica. Rotgefärbt sind H-2Kb positive Zellen. Diese sind in WT (A) und Knockout-Mäusen (B) in der Adventitia deutlich zu sehen, allerdings etwas deutlicher in den WT-Mäusen (A). In der Media sind sie nur spärlich vorhanden.

## 5.7 Nachweis von cGMP

Um das weitgehende Fehlen der inflammatorischen Antwort in den Knockout.-Mäusen zu verstehen, wurde eine Färbung für cGMP, dem für die verschiedenen NOS Formen gemeinsamen Signalmolekül (Second Messenger), durchgeführt und die angefärbte Fläche anschließend quantifiziert.

Die für cGMP positiv gefärbte Fläche in der Intima der eNOS  $-/-$  Mäuse war mehr als sieben mal größer ( $p < 0,05$ ), die der Media hingegen drei mal größer ( $p < 0,01$ ) als in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis sprach dafür, dass die NO Synthese in den eNOS  $-/-$  Mäusen hochreguliert war. Es folgte deswegen die Untersuchung der verschiedenen NOS-Isoformen.

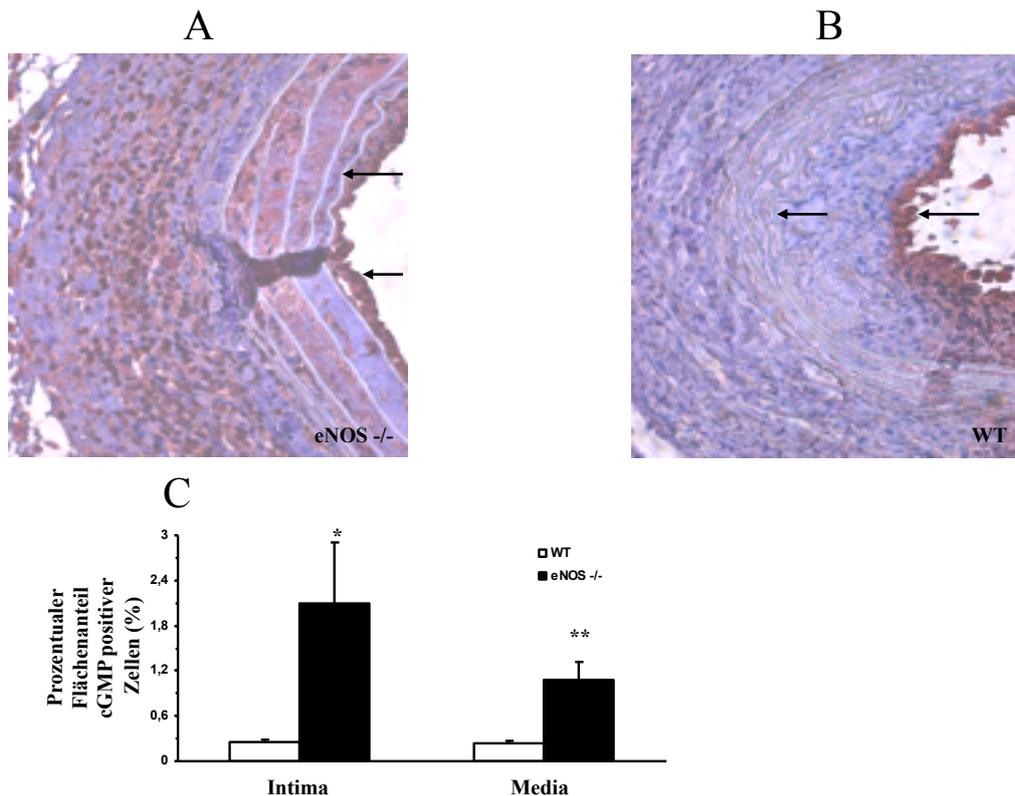


Abbildung 9: Nachweis von cGMP

cGMP gefärbte Areale in den transplantierten Gefäßen nach 4 Wochen in den beiden Empfängergruppen in 400 facher Vergrößerung. Eine deutlich positives Signal für cGMP herrscht in der ganzen Gefäßwand bei den Knockout-Mäusen (A) vor. Sogar in der Adventitia ist ein deutliches positives Signal zu sehen. Bei den Wildtyp Mäusen ist das Signal in der Media schwach (B). In der Intima sind die positiv gefärbten Zellen fast nur auf das Endothel beschränkt. In Diagramm C ist der Unterschied für den prozentualen Flächenanteil positiv gefärbter Zellen in der Intima und Media signifikant, wobei der Unterschied in der Media deutlicher hervorsticht.

## 5.8 Nachweis der NOS-Isoformen

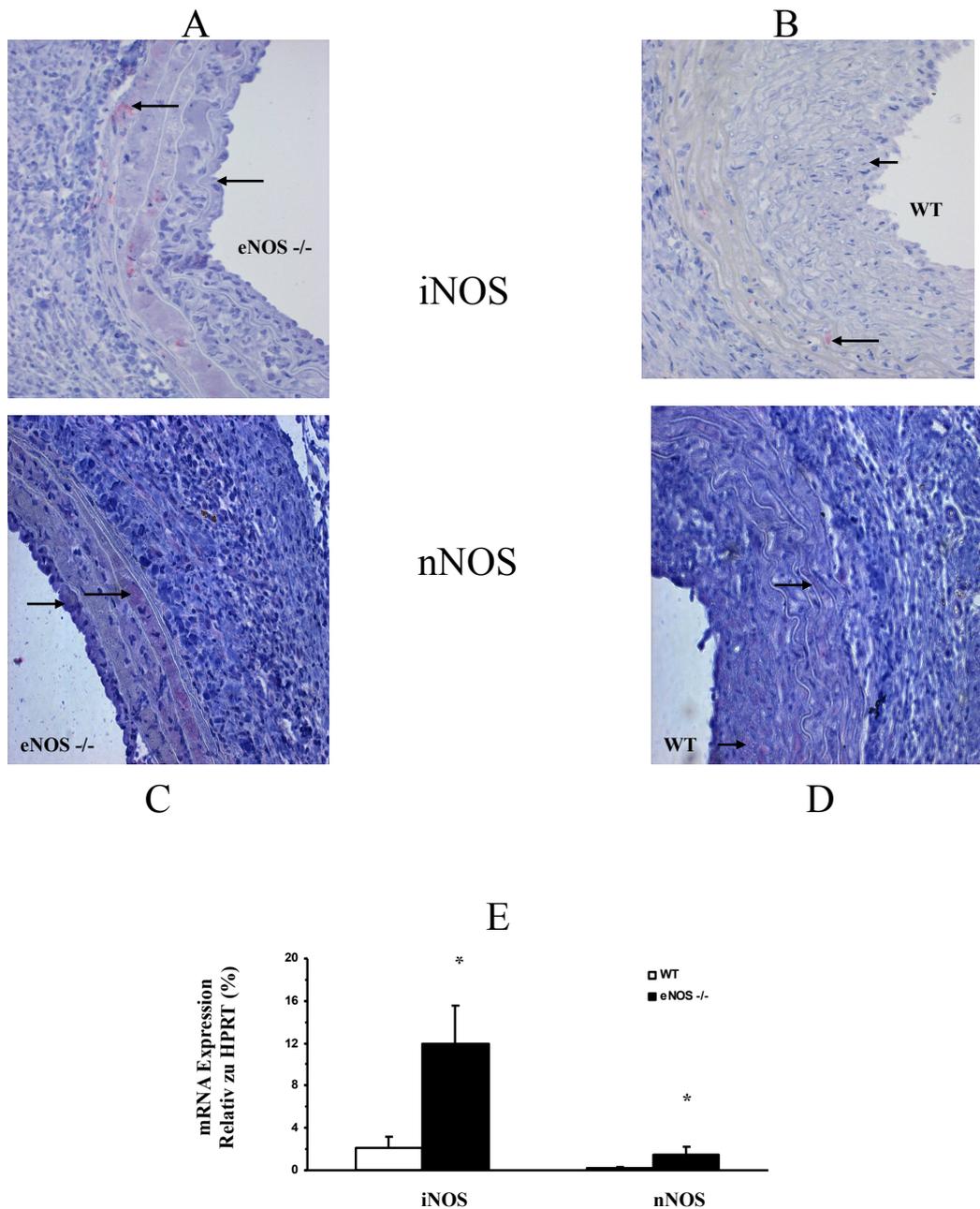
Die immunohistochemischen Färbungen waren leider zu schwach ausgeprägt, um diese quantitativ bewerten zu können. Dagegen waren die PCR Untersuchungen weitaus eindeutiger.

Die Untersuchung der Aorten der BALB/c-Spendertiere zum Zeitpunkt der Transplantation zeigten eine starke Expression von eNOS (mRNA-Expression relativ zu HPRT, 41,4 +/- 14,7%). Sowohl iNOS (1,7 +/- 0,3%) als auch nNOS (1,0 +/- 0,9%) betreffend war diese weitaus geringer ausgeprägt.

In den Empfängertieren zeigte sich die Verteilung der einzelnen NOS-Isoformen wie folgt:

Die eNOS-Expression war zum Zeitpunkt der Transplantation in den Empfängertieren geringer als in den Spendertieren. In der eNOS  $-/-$  Gruppe (5,9  $\pm$  1,0%) ergab sich im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (9,3  $\pm$  2,0 %) kein signifikanter Unterschied ( $p < 0,15$ ).

Hingegen zeigte sich die Expression von iNOS und nNOS in der eNOS  $-/-$  Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dies konnte bereits zuvor durch immunohistochemische Färbungen gezeigt werden. Durch RT-PCR gelang es, diesen Unterschied noch zu verdeutlichen. Die mRNA-Expression von iNOS und nNOS in den Knockout-Mäusen war 4 Wochen nach Transplantation im Vergleich zur Kontrollgruppe mit vier- bis fünffacher Erhöhung signifikant hochreguliert.



**Abbildung 10: Nachweis der NOS-Isoformen**

Färbungen der NOS Isoformen iNOS und nNOS in Gefäßauschnitten der transplantierten Gefäßen nach 4 Wochen bei in 400 facher Vergrößerung. Sie zeigen jeweils die positiv gefärbten Areale für iNOS in den Knockout-Mäusen (A) und den Wildtyp Mäusen (B). Die Signale sind eher schwächlich sowohl für Knockout-Mäuse als auch Wildtyp Mäuse. Etwas deutlicher ist die Färbung für iNOS in der Intima und Media der Knockout-Mäuse als in den Wildtyp Mäusen. Bei nNOS war das Bild ähnlich. Die Färbung ist in beiden Gruppen eher schwach allerdings ein wenig deutlicher in den Knockout-Mäusen (C) als in den Wildtyp Mäusen (D) sowohl in der Intima als auch in der Media. Die mRNA Expression (Diagramm E) zeigte dagegen eindeutige Unterschiede. Die Expression von iNOS und von nNOS in Knockout-Mäusen, hier als schwarzer Balken abgebildet, war signifikant größer als in den Wildtyp Mäusen, hier als weißer Balken dargestellt.

## 6 Diskussion

### 6.1 Diskussion der Versuchsergebnisse

Die Niereninsuffizienz ist ein zunehmendes Problem unserer Gesellschaft. Erkrankungen wie Bluthochdruck/arterielle Hypertension und Diabetes mellitus Typ 2 enden im Verlauf häufig in chronischem Nierenversagen [3, 6]. Behandlungsmöglichkeiten bestehen in Hämodialyse und Nierentransplantation [10]. Leider ist die Mortalität von Hämodialysepatienten durch kardiovaskuläre Erkrankungen im Vergleich zur Gesamtbevölkerung stark erhöht [7]. Dies macht sich besonders bei jungen Menschen bemerkbar. Die jährliche Mortalität bei 25-34 jährigen Dialysepatienten ist vergleichbar mit der von über 85 jährigen aus der Gesamtbevölkerung [7]. Als Alternative zur Hämodialyse bietet sich daher die Nierentransplantation an. Eine Transplantation ist der Dialysebehandlung nicht nur überlegen in Bezug auf Überleben und Lebensqualität des Organempfängers, sondern auch auf lange Sicht die kostengünstigere Alternative [10]. Während zu Beginn der Transplantations-Ära vor allem akute Abstoßungen die Überlebenszeit transplantierte Nieren limitierten, ist heute die chronische Abstoßung das Haupthindernis für ein unbegrenztes Funktionieren eines Transplantates [26]. Die chronische Abstoßung ist ein multifaktorieller Vorgang der sowohl durch immunologische wie auch nicht-immunologische Faktoren bedingt ist [27]. Im Rahmen einer chronischen Abstoßung kommt es in den arteriellen Gefäßen zur charakteristischen Neointimabildung. Hierbei handelt es sich um den Umbau von Intima und Media [27]. Dieser Umbau beinhaltet die Einwanderung von Entzündungszellen sowie glatter Muskulatur. Dies führt zu einer Verdickung der Intima mit langsamer Okklusion des Gefäßes. [27]. Dies resultiert wiederum in Ischämie in dem von der Arterie versorgten Gebiet. Die Bildung der Neointima ist histopathologisch deskriptiv für die Transplantationsvaskulopathie. Sie ist als Ursache der chronischen Abstoßung der wichtigste Faktor für den späteren Verlust des Organs nach Transplantation [27].

Im Verlauf der Transplantationsvaskulopathie kommt es im Anfangsstadium zum Verlust des Endothels, Adhäsion von Plättchen und Leukozyten im Subendothel und zur Modifikation von glatten Muskelzellen in der Media. Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen infiltrierten danach die Adventitia und Intima. Im Tiermodell

(explantierte Aortenringe) ist nach vier bis acht Wochen die Neointima vollständig ausgebildet [28].

NO gilt als der potenteste bekannte endogene Vasodilatator [47]. Außerdem spielt NO eine Rolle in der Hemmung der vom Endothel abgeleiteten Plättchen und Leukozytenaggregation und könnte daher einen Einfluss auf die Entstehung der Neointima haben [47]. Akyurek et al. generierten in einem Rattentransplantationsmodell künstlich eine TV. Anschließend wurde untersucht, inwieweit NO eine Rolle in der TV spielt. Die eNOS-Expression war erhöht in der Neointima, die induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (iNOS) in den Gefäßzellen der Media und Intima. Daher ist davon auszugehen, dass NO eine Rolle in der TV spielt [65].

Die Beeinflussung von NO könnte daher von Interesse sein und die Erforschung der unterliegenden Mechanismen könnte einen Ansatz für die Therapie der Transplantationsvaskulopathie darstellen.

Deshalb ist in dieser Arbeit die Rolle der verschiedenen NO Synthesen bei der Entstehung der Neointima-Bildung untersucht worden. Dazu wurde ein etabliertes Aorten Transplantationsmodell bei komplett histoinkompatiblen Mausstämmen gewählt.

### **6.1.1 Unterschiede in der Neointima Bildung zwischen eNOS Knockout Mäusen und der Kontrollgruppe**

Die Neointima war in den Wildtyp Empfängermäusen bereits 4 Wochen nach der Transplantation vorhanden, wie man in Abbildung 6 sehen kann.

Die eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse dagegen schienen im besonderen Maße vor der Entstehung einer Neointima geschützt zu sein wie in Abbildung 6 zu sehen ist. Zudem zeigte sich eine weitaus geringer ausgeprägte Akkumulation von Alpha-Aktin-positiv gefärbten Zellen, eine geringere Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie eine stark verminderte Infiltration von Lympho- und Monozyten in den transplantierten Gefäßen. Außerdem war in einigen Schnitten ausschließlich an der luminalen Seite der transplantierten Gefäße eine dünne Schicht  $\alpha$ -SMA positiver Zellen zu sehen. Dies deutete darauf hin, dass diese glatten Muskelzellen aus dem zirkulierenden Blut des Empfängers in das Endothel eingewandert waren und dort im Verlauf an der Formation einer Neointima beteiligt waren.

### **6.1.2 Das Verhalten der Entzündungszellen in beiden Gruppen und deren Herkunft**

Wie bereits erwähnt, folgt die Bildung der Neointima einer bestimmten Reihenfolge [28]. Den Beginn macht der Verlust des Endothels, wie man auch auf den jeweiligen Bildern 4 Wochen nach der Transplantation erkennen kann. Der Verlust des Endothels ließ sich in beiden Gruppen beobachten (siehe Abbildung 6-11 und 13-14). Darauf folgt die Einwanderung von Makrophagen. Diese wurden durch F4-80 gefärbt. Es zeigte sich deutlich weniger Makrophagen-Aktivität in der Intima der Knockout-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 11). In der Media war kein signifikanter Unterschied zu sehen. Die eingewanderten Monozyten exprimieren dann die Adhäsionsmoleküle. Diese sorgen wiederum dafür, dass die Einwanderung von Leukozyten erleichtert wird [66]. In der vorliegenden Studie wurde Gebrauch von VCAM und PECAM-1 als Marker für die Adhäsionsmoleküle gemacht. Die Adhäsionsmoleküle VCAM und PECAM-1 waren in unserem Versuch in der Intima der Knockout-Gruppe weniger präsent als in der Kontrollgruppe, (siehe Abbildung 8 und 9). Nur bei PECAM-1 konnte man auch einen signifikanten Unterschied in der Media sehen. VCAM war in der Media in den beiden Gruppen kaum nachweisbar. Folgerichtig waren daher auch die Lymphozyten, zumindest die CD3 positiven und die CD8 positiven T-Lymphozyten in der Intima in weitaus größerer Menge in der Knockout-Gruppe vertreten als in der Kontrollgruppe. Sehr gut zu sehen war dies anhand von Abbildung 10 für die CD8 Färbung. Die Unterschiede der Expression von CD3 und CD8 waren die in der Intima signifikant. Bei CD4 war auch ein Unterschied in Intima und Media zusehen, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant. Damit konnten wir eine deutlich herabgesetzte Entzündungsreaktion in der Knockout-Gruppe zeigen. Um die Herkunft der eingewanderten Zellen zu untersuchen, wurde H-2Kb benutzt, welches spezifisch für Zellen des C57BL/6 Stammes, also des Empfänger-Stammes ist. In den Knockout-Mäusen waren kaum positiv gefärbte H-2Kb Zellen zu sehen. In den Kontrollmäusen war besonders die Färbung der Neointima mit H-2Kb Zellen sehr deutlich. Daraus lässt sich schließen, dass die Entzündungszellen vom Empfänger stammen.

### **6.1.3 Das Verhalten und die Herkunft der glatten Muskelzellen in den beiden Gruppen**

Bei Aorten-Transplantations-Modellen in Ratten ist die Entstehung der Neointima gekennzeichnet durch den Verlust von Endothelzellen nach circa einer Woche, gefolgt von der Akkumulation von  $\alpha$ -SMA+ Zellen, Lymphozyten und Makrophagen in die Intima. Es handelt sich hierbei um einen dynamischen Prozess, der innerhalb der ersten Woche nach der Entnahme der Gefäße eintritt [31].

In unserem Experiment ist eine deutliche Infiltration von Alpha-Aktin-positiven Zellen in der Intima der Knockout-Mäuse zu sehen (Abbildung 7). Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Knockout-Gruppe war am deutlichsten in der Intima, doch auch in der Media war er signifikant. Neuere Studien konnten deutlich zeigen, dass vom Empfänger ausgehende  $\alpha$ -SMA+ Zellen den Hauptanteil der profilierenden Zellen in der Neointima ausmachen, und dass die Expansion noninflammatorischer Zellen der Invasion von Lymphozyten und Makrophagen vorhergeht. Religa et al. [67] konnten zeigen, dass bei einem Ratten-Aorten-Transplantationsmodell 4 Wochen nach Transplantation 71% der Zellen in der Neointima vom Empfänger stammten. Diese Zellen könnten von  $\alpha$ -SMA+ Zellen, von Myofibroblasten im vaskulären Gewebe des Empfängers, oder von zirkulierenden Knochenmark-Stammzellen entstammen. Experimente mit Aorten-Transplantationsmodellen und Herz-Transplantationsmodellen bei verschiedenen Mausstämmen konnten zeigen, dass es sich bei den Neointima-Zellen hauptsächlich um Stammzellen aus dem Knochenmark („non hematopoietic mesenchymal stem cells“) des Empfängers handelte [28, 68, 69]. In transplantierten Koronararterien war eine deutliche Neointima-Bildung nach 4 Wochen zu sehen, bei der mehr als 80% der Zellen vom Empfänger ausgingen [69]. Die Autoren konnten auch zeigen, dass sich eine hämatopoetische Fraktion von Knochenmarkszellen in Gefäßzellen differenzierte. Dabei wird gegenwärtig diskutiert, ob und wie weit die proliferierenden  $\alpha$ -SMA+ Zellen des Spenders, zirkulierende Empfänger Alpha-Aktin (alpha-SMA) positive Stammzellen oder Stammzellen in der Adventitia [70] zur Neointima-Bildung beitragen [27, 44]. Erschwerend bei diesem Problem kommt hinzu, dass die Bildung der Neointima ausgesprochen zeitabhängig ist und dass, bedingt durch die Plastizität der  $\alpha$ -SMA+ Zellen, die histologische Identifikation nicht immer einfach ist [44]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch mittels Anfärbung des

empfängerspezifischen Histokompatibilitäts-Antigen H-2KB gezeigt werden, dass Zellen des Empfängers für die chronische Abstoßung verantwortlich waren.

#### **6.1.4 Herkunft von NO, Rolle der NO Synthasen**

In einer früheren Studie von Lee et al. wurde bereits die Rolle der vom Spender stammenden eNOS untersucht [30]. Hierzu wurde ein Aorten-Transplantationsmodell genutzt, bei dem Aorten von eNOS-defizienten Mäusen und Wildtyp Mäusen in histoinkompatible Wildtyp Mäuse eingepflanzt wurden. Bei den eNOS-defizienten transplantierten Aorten entwickelte sich im Gegensatz zu den transplantierten Wildtyp Aorten eine stärkere Neointima-Bildung. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass vom Spender ausgehendes, hauptsächlich durch eNOS synthetisiertes NO, zum Schutz vor Abstoßung im Frühstadium nach Transplantation beiträgt. Da die Abstoßung und Neointima-Bildung durch die Empfängerzellen stattfindet, ist die Synthese des vom Spender ausgehenden NO wahrscheinlich kurz nach der Transplantation ineffizient. Interessanterweise exprimierten die transplantierten eNOS-defizienten Aorten große Mengen an iNOS, die allerdings nicht ausreichten, um die Neointima-Bildung zu unterbinden [30]. Dies stellte sich anders dar, wenn eine Überexpression von iNOS (durch Gentransfer mittels *in vitro* Transfektion mit einem adenoviralem Vektor) in eNOS-defizienten transplantierten Aorten induziert wurde: das eNOS defiziente Aortentransplantat war dann vollständig von der Neointima-Bildung geschützt [30]. In dieser Studie gab es keinen Unterschied in der eNOS Expression in den transplantierten Wildtyp Aorten. Somit kann das unterschiedliche Ausmaß der Neointimabildung in unserer Studie nicht durch eNOS Defizienz im Transplantat erklärt werden.

Auch Unterschiede im arteriellen Blutdruck zwischen eNOS-defizienten Mäusen und WT-Mäusen können kaum den Unterschied in der Ausprägung der Neointima in unserer Studie erklären. Es ist ausreichend dokumentiert, dass eNOS<sup>-/-</sup> Mäuse einen hypertensiven Phänotyp aufweisen. Im Gegensatz dazu sind iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse interessanterweise hypotensiv [60]. Deswegen hätte die Hypertension in den eNOS<sup>-/-</sup>-Mäusen die Neointima-Bildung eher begünstigen müssen. Daher ist der proliferationshemmende Effekt bei eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen in dieser Studie wahrscheinlich eher auf molekularer Ebene durch NO-vermittelte regulatorische Prozesse *in situ* zu suchen.

### **6.1.5 Expression der verschiedenen NOS und cGMP in unserem Model und Konsequenz**

In gesunden Arterien inhibiert das vom Endothelium produzierte NO die Anhaftung von Plättchen- und Leukozyten, es unterdrückt die Expression von Adhäsionsmolekülen und unterbindet die Proliferation von  $\alpha$ -SMA+ Zellen. Bei der Transplantat-Abstoßung induziert eNOS die Apoptose von Makrophagen und  $\alpha$ -SMA+ Zellen [47]. Diese Tatsache macht es sehr wahrscheinlich, dass einer Störung der NO-Produktion eine wichtige Rolle in der Entstehung der Transplantationsvaskulopathie zukommt. Die Aufgabe dieser Studie war es, die Rolle(n) der NO Synthasen in einem Maus-Aorten-Transplantationsvaskulopathie-Modell zu beleuchten. Obwohl die eNOS Expression in den transplantierten Arterien aufgrund des Studiendesigns zum Zeitpunkt der Transplantation gleich war, kam es zu einem signifikanten Verlust von eNOS innerhalb von vier Wochen. Dies lässt sich durch den Verlust von Endothelzellen erklären, wie es in dieser Art Modell bereits beschrieben wurde [31]. Dieser Prozess war in beiden Empfänger-Gruppen im gleichen Ausmaß vorhanden. Allerdings waren in unserer Studie die eNOS-/- Mäuse von der Neointima-Bildung durch erhöhte Aktivität von iNOS und nNOS, die zu einer signifikant höheren NO Produktion führten, geschützt. Diese Überproduktion von NO konnte indirekt durch färberischen Nachweis des second messengers cGMP gezeigt werden, der sich in signifikant größeren Mengen in den eNOS-defizienten Mäusen zeigte (siehe Abbildung 13). Dies deutet auf eine protektive Funktion der vom Empfänger ausgehenden NO Überproduktion oder enzyspezifische Effekte dieser Isoformen hin. Die Kompensation einer gestörten eNOS-Produktion durch die anderen Isoformen könnte einer der adaptiven Haupt-Mechanismen bei transgenen Mäusen sein [46]. Es sollte hier angemerkt werden, dass es bei der immunhistologischen Färbung Probleme gab, die verschiedenen NOS Synthasen darzustellen. Die Färbungen waren schwach trotz stärkster Verdünnung der Antikörper (Abbildung 14). Der Nachweis von NOS durch PCR dagegen war eindeutig, und die Resultate in guter Übereinstimmung mit der technisch einwandfreien immunohistochemischen Färbung von cGMP als second Messenger.

### **6.1.6 iNOS**

Die jeweilige Rolle aller drei NOS-Isoformen in der Transplantationsvaskulopathie ist bis jetzt noch nicht genauer untersucht worden. Allerdings deuten die Ergebnisse dieser

Arbeit daraufhin, dass das Thema komplexer ist als bisher vermutet. In einer systematischen pathoanatomischen Studie über den Zeitverlauf der Transplantat-Arteriosklerose an Ratten stieg die iNOS-Expression im Verlauf in Intima und Adventitia an [65]. In der Media allerdings fiel die iNOS-Expression ab. Diese Vorgänge liefen ohne eine signifikante Änderung in der eNOS-Expression ab. iNOS wurde von  $\alpha$ -SMA+ Zellen, Makrophagen und auch Endothelzellen exprimiert [65]. In verschiedenen Maus-Transplantationsmodellen war erhöhte iNOS-Expression durchgehend mit einer verminderten Neointima-Bildung assoziiert. So war beispielsweise die Aktivität von iNOS im Rahmen der Transplantatabstoßung erhöht, was mit einem protektiven Effekt bei der Transplantat-Arteriosklerose bei herztransplantierten Mäusen durch die Unterdrückung neointimaler Akkumulation von glatten Muskelzellen assoziiert war [50]. Das Inhibieren von iNOS führte zu erhöhter intimaler Verdickung bei einem Aorten-Transplantationsmodell mit Ratten [71]. Im Gegensatz dazu konnte eine Überexpression von iNOS in einem adenoviral medierten Gentransfer *in vivo* teilweise vor intimaler Hyperplasie schützen [30, 71]. Diese Ergebnisse werden durch unsere Studie unterstützt, da die gesteigerte Aktivität von iNOS bei eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen (siehe Abbildung 14) mit einer verminderten Neointima-Bildung, verminderter Expression von Adhäsionsmolekülen und verminderter Zellinfiltration einherging.

Unter normalen Bedingungen ist die iNOS Expression (in Makrophagen) grundlegend durch die geringe Produktion von eNOS und cGMP reguliert; bei eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen ist die eNOS-Produktion grundlegend gestört [61, 63]. In unserer Studie war eNOS in den Spenderarten in gleichem Umfang zum Zeitpunkt der Transplantation in jeweils eNOS<sup>-/-</sup> und WT Mäusen vorhanden. Daher kann man davon ausgehen, dass die Aktivierung von iNOS auf dem NF $\kappa$ B-Signalweg [63] und/oder anderen Signalwegen zur Zeit der Transplantation intakt war. Die Induktion von iNOS/nNOS sollten nach unserem Ermessen durch die vorhandenen Signalwege gewährleistet sein, allerdings war nicht genug iNOS/eNOS in den WT-Mäusen vorhanden, um die Invasion der vom Empfänger ausgehenden Zellen, die zur Neointima-Bildung verantwortlich sind zu verhindern. Die verminderte Neointima-Bildung bei den eNOS<sup>-/-</sup> Mäusen hatte ihren Ursprung in der Hochregulation von anderen NOS Isoformen. Falls eNOS die Voraussetzung für eine Induktion dieser Hochregulation darstellt, muss diese von Zellen aus der Gefäßwand des Spenders ausgegangen sein.

### **6.1.7 nNOS**

In den eNOS defizienten Mäusen wurde in dieser Arbeit eine signifikante Hochregulation von nNOS nach Transplantation festgestellt. Dies erweitert die Rolle von nNOS im Rahmen der vaskulären NO-Bildung. Im Gegensatz zu früheren Annahmen spielt nNOS eine wichtige Rolle nicht nur im neuronalen Gewebe, sondern auch in der Arterienwand und könnte auch physiologische Bedeutung für die Regulierung des Gefäßtonus haben. Die Aortenfunktion bei Mäusen scheint zumindest teilweise von nNOS abhängig zu sein [72]. Es konnte in perfundierten, schlagenden Herzen von eNOS-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass der bradykinininduzierte Koronarfluss durch kompensatorische nNOS Hochregulierung im Koronararterienendothel gewährleistet werden konnte [62, 73]. Die vaskuloprotektive Rolle von nNOS konnte auch in einem Karotiden-Ligationsmodell gezeigt werden. Hier konnte man 4 Wochen nach der Ligation der Karotiden in den nNOS-defizienten Mäusen eine beschleunigte Neointima-Bildung nachweisen, obwohl die iNOS-Hochregulation mit der Kontrollgruppe vergleichbar war. Interessanterweise fehlte nNOS in der Arterienwand vor dem Eingriff und war danach in den Kontrollmäusen hochreguliert [74]. Außerdem gab es einen Zusammenhang zwischen der ausgedehnten Produktion von iNOS und nNOS und der Präsenz von Makrophagen, Endothelzellen und  $\alpha$ -SMA+ Zellen in der Neointima in frühen und fortgeschrittenen arteriellen Läsionen beim Menschen [74]. Die Rolle der nNOS Expression in der Transplantationsvaskulopathie wurde dagegen bisher noch nicht untersucht. Unsere Studie konnte eine iNOS-Hochregulation in der Knockout-Gruppe zeigen (siehe Abb. 14). Da die eNOS-/- Mäuse eine geringere Ausprägung der Transplantationsvaskulopathie zeigten, deuten unsere Ergebnisse auf eine wichtige Rolle von nNOS in der Verhinderung der Neointima-Bildung bei eNOS-/- Mäusen hin.

### **6.1.8 Kompensation von iNOS und nNOS bei eNOS Mangel**

In unserer Studie war die Hochregulation von iNOS sowie nNOS mit einer signifikant erhöhten NO Produktion in den eNOS-/- Mäusen assoziiert. Es ist anzunehmen, dass die vom eNOS-defizienten Empfänger ausgehenden Zellen, die in das transplantierte Gefäß einwandern, die Hauptquelle von NO darstellen. Obwohl die Neointima-Bildung in den eNOS-/- Mäusen signifikant reduziert waren, war das Organ doch nicht vollständig von der Einwanderung von Zellen des eNOS-defizienten Empfängers

geschützt. Dies konnte durch die Färbung von Klasse II Major Histocompatibility Complex demonstriert werden. Es war eine deutlich positive Färbung 4 Wochen nach der Transplantation zu sehen, was für eine Invasion des transplantierten Gefäßes durch Empfängerzellen spricht. Während  $\alpha$ -SMA+ Zellen in der Media deutlich reduziert waren, gab es keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl von Makrophagen in den beiden Gruppen. Daher kann man davon ausgehen, dass  $\alpha$ -SMA+ Zellen und Makrophagen die Hauptquelle der NO Produktion 4 Wochen nach Transplantation darstellten und dadurch das transplantierte Gefäß von weiterem Neointimawuchs beschützte. Es konnte gezeigt werden, dass eNOS essentiell wichtig für die Funktion von hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen ist [75]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass fehlerhaftes Rekrutieren von Knochenmark-Stammzellen auch einen Anteil an der verminderten Neointima-Bildung und der abgeschwächten Abstoßungsreaktion hatten. Allerdings würde ein Mangel an Stammzellen nicht die Hochregulation von iNOS und nNOS im Rahmen der Transplantatabstoßung erklären. Darüber hinaus könnte es sein, dass Knochenmark-Stammzellen gar nicht die hauptsächliche Quelle der Neointimazellen im Maus-Aorten-Transplantationsmodell darstellen [33, 39, 45, 68]. Insgesamt kann man sagen, dass die vorliegende Studie zeigt, dass vom Empfänger ausgehende NOS Isoformen wichtig für die Regulation der Neointima-Bildung sind. In unserem Experiment haben wir uns hauptsächlich mit Intima und Media beschäftigt. Doch auch in der Adventitia laufen unter anderem inflammatorische Prozesse ab, die untersucht werden sollten. Dies könnte Gegenstand für weitere Studien sein. Natürlich ist hier nur ein Aspekt in der Genese der Transplantationsvaskulopathie beleuchtet. Tierexperimente können nicht erschöpfend über alle Kompensations-mechanismen im Körper Auskunft geben.

## **6.2 Zusammenfassung und Ausblick**

In unserer Studie konnte eine gesteigerte Neointima-Bildung, Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und eine gesteigerte Infiltration von Entzündungszellen in die Gefäßwand bei eNOS WT Mäusen zum Zeitpunkt 4 Wochen nach Arterientransplantation gezeigt werden. eNOS defiziente Mäuse dagegen waren von der Neointima-Bildung geschützt, und zwar durch die vermehrte Synthese von NO, wie indirekt durch erhöhtes Vorkommen von cGMP gezeigt werden konnte. Die vermehrte Synthese von NO konnte durch eine signifikante Hochregulierung von iNOS und nNOS

erklärt werden. Die erhöhte Aktivität dieser Isoformen könnte förderlich für die Prävention des vaskulären Remodelings in der frühen Posttransplantations-Phase sein.

### **6.3 Bedeutung der experimentellen Befunde für zukünftige Behandlungsmöglichkeiten der Transplantationsvaskulopathie**

Die aktuelle Empfehlung zur Behandlung nach Organtransplantation besteht aus Immunsuppressiva, meist Cyclosporin, Mycophenolat Mofetil, Tacrolimus und teilweise auch Glukokortikoiden. Diese Medikamente konnten das Risiko der akuten Abstoßung verhindern, die chronische Abstoßung hingegen stellt weiterhin ein großes Problem dar [16]. Interessanterweise haben diese Medikamente eine negative Wirkung auf die NOS Isoformen. Die Gabe von Tacrolimus in Kombination mit Azathioprin geht z.B. mit einer verminderten eNOS-Expression und endothelialer Dysfunktion einher [71]. Cyclosporin inhibiert iNOS in vitro und beschleunigte in einigen Studien die Entstehung einer Arteriosklerose. In einigen Experimenten fanden sich Hinweise, dass Steroide iNOS inhibieren oder die Expression vermindern [76]. Abgesehen von ihrem Einfluss auf die NOS-Isoformen haben Immunsuppressiva zahlreiche weitere unerwünschte Effekte. Zum Beispiel führt die langfristige Einnahme von Calcineurininhibitoren zu einer interstitiellen Fibrose in den transplantierten Nieren [26].

Erhöhte Cholesterin-, Triglyzerid-, Homocystein- und Blutglukosewerte finden sich häufig nach Nierentransplantationen. Dies wird zumindest anteilig auf die Gabe von Cyclosporin, Tacrolimus und Steroiden zurückgeführt [71]. Wie in unserem und vorangegangenen Versuchen gezeigt werden konnte, stellt NO, gebildet durch die verschiedenen NOS-Isoformen, einen Schutz vor Transplantationsvaskulopathie dar. Dies wurde besonders eindrücklich mit Hilfe eines Gentransfers über einen Adenovirus-Vektor demonstriert, wodurch iNOS direkt an den Ort des vaskulären Schadens gebracht werden konnte [71, 76]. Damit konnte in einem Rattenmodell die Allograft-Arteriosklerose komplett unterbunden bzw. verhindert werden [76]. In einem anderen Versuch derselben Arbeitsgruppe wurde im Rahmen einer ähnlichen Untersuchung bei Ratten und Schweinen eine 95%ige Reduktion der Neointima in Arterien von Ratten und eine 52%ige Minderung der Neointima in Schweinen gezeigt [71]. Die proinflammatorische Eigenschaft des Adenovirus fiel offenbar nicht ins Gewicht. Ein iNOS Gentransfer stellt somit womöglich eine alternative Therapiemöglichkeit dar, welche es weiter zu untersuchen gilt.

Nitrit als NOS- unabhängige NO-Quelle in der Nahrung konnte bei eNOS-/-Mäusen das Gleichgewicht von NO wieder herstellen und vor Ischämie-Reperfusionsschäden schützen [77].

Wie bereits formuliert, könnte es sich hierbei um einen potentiellen Ansatz in Bezug auf neue Therapieformen in der Behandlung der chronischen Transplantationsvaskulopathie handeln.

## Abkürzungsverzeichnis

Alpha-SMA+	=	alpha smooth muscle actin positiv = $\alpha$ -SMA+ = Alpha-Aktin-positiv gefärbt, glatte Muskelzellen
BK Virus	=	Polyoma virus B.K. steht für die Initialen des Patientens Von dessen Urin der Virus 1971 isoliert wurde
CAN	=	Chronic Allograft Nephropathy = chronische Transplantat Nephropathie
CD	=	cluster of differentiation
cGMP	=	cyclic guanosine monophosphate = Cyclisches Guanosinmonophosphat
CNI	=	Calcineurin Inhibitor
eNOS	=	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
iNOS	=	inducible Stickstoffmonoxid Synthase
k.o.	=	Knockout-Maus
MHC	=	Major Histology Complex
MMF	=	MycophenolateMofetil
MPGN	=	Membranproliferative Glomerulonephritis
nNOS	=	neuronale Stickstoffmonoxid Synthase
NO	=	Nitric oxide = Stickstoffmonoxid
NOS	=	Nitric oxide Synthase = Stickstoffmonoxid Synthase
NODAT	=	New-Onset Diabetes After Tranplantation
PCR	=	Polymerase Chain Reaction = Polymerase Kettenreaktion
PECAM	=	Platelet endothelial cell adhesion molecule = Plättchen Endothel Zell Adhäsionsmolekül
RAAS	=	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
SMC+	=	Smooth Muscle Cells = glatte Muskelzellen
SMLC precursor cells	=	smooth muscle like cells = glatten Muskelzellen ähnelnde
TV	=	Transplantationsvaskulopathie
VCAM	=	Vascular cell Adhesion Molecule = Vaskuläres Zell Adhäsionsmolekül
WT	=	Wildtyp

## Literaturverzeichnis

1. U. Frei, H.-J.S.-H., *Nierenersatztherapie in Deutschland*. 2008.
2. Padulles, A., et al., *Developments in renal pharmacogenomics and applications in chronic kidney disease*. *Pharmgenomics Pers Med*, 2014. **7**: p. 251-66.
3. Ritz, E., et al., *End-stage renal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions*. *Am J Kidney Dis*, 1999. **34**(5): p. 795-808.
4. Keane, W.F., et al., *The risk of developing end-stage renal disease in patients with type 2 diabetes and nephropathy: the RENAAL study*. *Kidney Int*, 2003. **63**(4): p. 1499-507.
5. Bell, S., et al., *End stage renal disease and survival in people with diabetes: a national database linkage study*. *QJM*, 2014.
6. Schmieder, R.E., *End organ damage in hypertension*. *Dtsch Arztebl Int*, 2010. **107**(49): p. 866-73.
7. Ortiz, A., et al., *Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure*. *Lancet*, 2014. **383**(9931): p. 1831-43.
8. Levey, A.S., et al., *Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: what do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? National Kidney Foundation Task Force on Cardiovascular Disease*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(5): p. 853-906.
9. Djamali, A., et al., *Medical care of kidney transplant recipients after the first posttransplant year*. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006. **1**(4): p. 623-40.
10. Jensen, C.E., P. Sorensen, and K.D. Petersen, *In Denmark kidney transplantation is more cost-effective than dialysis*. *Dan Med J*, 2014. **61**(3): p. A4796.
11. Ponticelli, C., M.A. Podesta, and G. Graziani, *Renal transplantation in elderly patients. How to select the candidates to the waiting list?* *Transplant Rev (Orlando)*, 2014.
12. Solez, K., et al., *International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology*. *Kidney Int*, 1993. **44**(2): p. 411-22.
13. Desvaux, D., et al., *Acute renal allograft rejections with major interstitial oedema and plasma cell-rich infiltrates: high gamma-interferon expression and poor clinical outcome*. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. **19**(4): p. 933-9.
14. Matas, A.J., et al., *The impact of an acute rejection episode on long-term renal allograft survival (t1/2)*. *Transplantation*, 1994. **57**(6): p. 857-9.
15. Basadonna, G.P., et al., *Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection*. *Transplantation*, 1993. **55**(5): p. 993-5.
16. Issa, N., A. Kukla, and H.N. Ibrahim, *Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: a review and perspective of the evidence*. *Am J Nephrol*, 2013. **37**(6): p. 602-12.
17. Sis, B., et al., *Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups*. *Am J Transplant*, 2010. **10**(3): p. 464-71.
18. Monaco, A.P., et al., *Current thinking on chronic renal allograft rejection: issues, concerns, and recommendations from a 1997 roundtable discussion*. *Am J Kidney Dis*, 1999. **33**(1): p. 150-60.
19. Yakupoglu, U., et al., *Post-transplant nephrotic syndrome: A comprehensive clinicopathologic study*. *Kidney Int*, 2004. **65**(6): p. 2360-70.
20. Andresdottir, M.B., et al., *Immunohistological and ultrastructural differences between recurrent type I membranoproliferative glomerulonephritis and chronic transplant glomerulopathy*. *Am J Kidney Dis*, 1998. **32**(4): p. 582-8.
21. Racusen, L.C., et al., *The Banff 97 working classification of renal allograft pathology*. *Kidney Int*, 1999. **55**(2): p. 713-23.

22. Torpey N, M.N., Watson E, Talbot D, *Renal Transplantation*. Oxford Specialist Handbooks. Vol. 1. 2010.
23. Bhathena, D.B., *Glomerular size and the association of focal glomerulosclerosis in long-surviving human renal allografts*. J Am Soc Nephrol, 1993. **4**(6): p. 1316-26.
24. Yokoyama, I., et al., *Effect of prolonged delayed graft function on long-term graft outcome in cadaveric kidney transplantation*. Clin Transplant, 1994. **8**(2 Pt 1): p. 101-6.
25. de Vries, A.P., et al., *Metabolic syndrome is associated with impaired long-term renal allograft function; not all component criteria contribute equally*. Am J Transplant, 2004. **4**(10): p. 1675-83.
26. Nankivell, B.J., et al., *The natural history of chronic allograft nephropathy*. N Engl J Med, 2003. **349**(24): p. 2326-33.
27. Mitchell, R.N. and P. Libby, *Vascular remodeling in transplant vasculopathy*. Circ Res, 2007. **100**(7): p. 967-78.
28. Religa, P., et al., *Extracellular matrix composition and cellular mechanisms of transplant vasculopathy in rat aortic allografts*. Transplant Proc, 2002. **34**(2): p. 687-8.
29. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
30. Lee, P.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis*. Transplantation, 2000. **69**(6): p. 1186-92.
31. Religa, P., et al., *Arteriosclerosis in rat aortic allografts: dynamics of cell growth, apoptosis and expression of extracellular matrix proteins*. Mol Cell Biochem, 2003. **249**(1-2): p. 75-83.
32. Chow, L.H., et al., *Intimal thickening develops without humoral immunity in a mouse aortic allograft model of chronic vascular rejection*. Circulation, 1996. **94**(12): p. 3079-82.
33. Li, J., et al., *Vascular smooth muscle cells of recipient origin mediate intimal expansion after aortic allotransplantation in mice*. Am J Pathol, 2001. **158**(6): p. 1943-7.
34. Johnson, P., et al., *Recipient cells form the intimal proliferative lesion in the rat aortic model of allograft arteriosclerosis*. Am J Transplant, 2002. **2**(3): p. 207-14.
35. Hillebrands, J.L., et al., *Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **107**(11): p. 1411-22.
36. Hillebrands, J., et al., *Recipient origin of neointimal vascular smooth muscle cells in cardiac allografts with transplant arteriosclerosis*. J Heart Lung Transplant, 2000. **19**(12): p. 1183-92.
37. Grimm, P.C., et al., *Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection*. N Engl J Med, 2001. **345**(2): p. 93-7.
38. Hillebrands, J.L. and J. Rozing, *Chronic transplant dysfunction and transplant arteriosclerosis: new insights into underlying mechanisms*. Expert Rev Mol Med, 2003. **5**(2): p. 1-23.
39. Hillebrands, J.L., et al., *Bone marrow does not contribute substantially to endothelial-cell replacement in transplant arteriosclerosis*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 194-5.
40. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response*. Lab Invest, 2002. **82**(5): p. 521-33.

41. Sasaki, Y., et al., *Role of endothelial cell denudation and smooth muscle cell dedifferentiation in neointimal formation of human vein grafts after coronary artery bypass grafting: therapeutic implications*. Heart, 2000. **83**(1): p. 69-75.
42. Fateh-Moghadam, S., et al., *Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy*. Circulation, 2000. **102**(8): p. 890-7.
43. Abele, S., et al., *Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(5): p. 1161-6.
44. De Geest, B., *The origin of intimal smooth muscle cells: are we on a steady road back to the past?* Cardiovasc Res, 2009. **81**(1): p. 7-8.
45. Rodriguez-Menocal, L., et al., *The origin of post-injury neointimal cells in the rat balloon injury model*. Cardiovasc Res, 2009. **81**(1): p. 46-53.
46. Godecke, A. and J. Schrader, *Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice--lessons from eNOS and myoglobin knockout mice*. Basic Res Cardiol, 2000. **95**(6): p. 492-8.
47. Weis, M. and J.P. Cooke, *Cardiac allograft vasculopathy and dysregulation of the NO synthase pathway*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 567-75.
48. Furchgott, R.F. and J.V. Zawadzki, *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine*. Nature, 1980. **288**(5789): p. 373-6.
49. Ignarro, L.J., et al., *Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery*. J Pharmacol Exp Ther, 1984. **228**(3): p. 682-90.
50. Koglin, J., et al., *Exacerbated transplant arteriosclerosis in inducible nitric oxide-deficient mice*. Circulation, 1998. **97**(20): p. 2059-65.
51. Moncada, S. and E.A. Higgs, *Nitric oxide and the vascular endothelium*. Handb Exp Pharmacol, 2006(176 Pt 1): p. 213-54.
52. Morishita, T., et al., *Vasculoprotective roles of neuronal nitric oxide synthase*. FASEB J, 2002. **16**(14): p. 1994-6.
53. Seki, T., et al., *In situ identification of messenger RNA of endothelial type nitric oxide synthase in rat cardiac myocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **218**(2): p. 601-5.
54. Sherman, T.S., et al., *Nitric oxide synthase isoform expression in the developing lung epithelium*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. L383-90.
55. Dinerman, J.L., et al., *Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4214-8.
56. Kubes, P., M. Suzuki, and D.N. Granger, *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(11): p. 4651-5.
57. Tsao, P.S., et al., *Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2176-82.
58. Garg, U.C. and A. Hassid, *Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells*. J Clin Invest, 1989. **83**(5): p. 1774-7.
59. Montezano, A.C. and R.M. Touyz, *Reactive oxygen species and endothelial function--role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. **110**(1): p. 87-94.

60. Shesely, E.G., et al., *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13176-81.
61. Connelly, L., M. Madhani, and A.J. Hobbs, *Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 10040-6.
62. Talukder, M.A., et al., *Up-regulated neuronal nitric oxide synthase compensates coronary flow response to bradykinin in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **44**(4): p. 437-45.
63. Connelly, L., et al., *Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 26480-7.
64. Dietrich, H., et al., *Mouse model of transplant arteriosclerosis: role of intercellular adhesion molecule-1*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(2): p. 343-52.
65. Akyurek, L.M., et al., *Inducible and endothelial nitric oxide synthase expression during development of transplant arteriosclerosis in rat aortic grafts*. Am J Pathol, 1996. **149**(6): p. 1981-90.
66. Heemann, U.W., et al., *Adhesion molecules and transplantation*. Ann Surg, 1994. **219**(1): p. 4-12.
67. Religa, P., et al., *Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries*. Transplantation, 2002. **74**(9): p. 1310-5.
68. Shimizu, K., et al., *Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 738-41.
69. Sata, M., et al., *Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis*. Nat Med, 2002. **8**(4): p. 403-9.
70. Hu, Y., et al., *Abundant progenitor cells in the adventitia contribute to atherosclerosis of vein grafts in ApoE-deficient mice*. J Clin Invest, 2004. **113**(9): p. 1258-65.
71. Shears, L.L., 2nd, et al., *Efficient inhibition of intimal hyperplasia by adenovirus-mediated inducible nitric oxide synthase gene transfer to rats and pigs in vivo*. J Am Coll Surg, 1998. **187**(3): p. 295-306.
72. Nangle, M.R., M.A. Cotter, and N.E. Cameron, *An in vitro study of corpus cavernosum and aorta from mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene*. Nitric Oxide, 2003. **9**(4): p. 194-200.
73. Huang, A., et al., *Neuronal NOS-dependent dilation to flow in coronary arteries of male eNOS-KO mice*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(2): p. H429-36.
74. Wilcox, J.N., et al., *Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2479-88.
75. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. Nat Med, 2003. **9**(11): p. 1370-6.
76. Shears, L.L., et al., *Inducible nitric oxide synthase suppresses the development of allograft arteriosclerosis*. J Clin Invest, 1997. **100**(8): p. 2035-42.
77. Bryan, N.S., et al., *Dietary nitrite restores NO homeostasis and is cardioprotective in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice*. Free Radic Biol Med, 2008. **45**(4): p. 468-74.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jan Dominik Kampmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Rolle der endothelialen NO-Synthase bei der Entstehung der Transplantationsvaskulopathie“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen**

Jan Dominik Kampmann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Zebger-Gong H, **Kampmann J**, Kong L, Roigas J, Sommer K, Hoff U, Krämer S, Peters H, Müller D, Dragun D, Querfeld U. Decreased transplant arteriosclerosis in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Transplantation*. 89:518-26, 2010

Alle Färbungen, Auswertungen der Färbungen (ausser H2-KB), sowie Fotos wurden von Jan Dominik Kampmann erstellt

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **Curriculum Vitae**

**"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."**



## Publikationsliste

Publikation 1: Zebger-Gong H, **Kampmann J**, Kong L, Roigas J, Sommer K, Hoff U, Krämer S, Peters H, Müller D, Dragun D, Querfeld U. Decreased transplant arteriosclerosis in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Transplantation*. 89:518-26, 2010

Publikation 2: Vase MØ, Maksten EF, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Andersen C, Møller MB, Sørensen SS, Jespersen B, **Kampmann J**, Søndergård E, Nielsen PS, d'Amore F. Occurrence and prognostic relevance of CD30 expression in Post-transplant Lymphoproliferative Disorders. *Leukemia and Lymphoma* 56:1677-1685, 2015

Publikation 3: Vase MØ, Maksten EF, Strandhave C, Søndergaard E, Bendix K, Hamilton-Dutoit S, Andersen C, Møller MB, Sørensen SS, **Kampmann J**, Eiskjær H, Iversen M, Weinreich ID, Møller B, Jespersen B, d'Amore F. HLA associations and risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in a Danish population-based cohort. *Transplantation Direct*, August 2015 - Volume 1 - Issue 7 - p e25 doi: 10.1097/TXD.0000000000000534

Publikation 4: Maksten EF, Vase MØ, **Kampmann J**, d'Amore F, Møller MB, Strandhave C, Bendix K, Bistrup C, Helle Thiesson H, Søndergaard E, Hamilton-Dutoit S, Jespersen<sup>B</sup>  
Post-transplant lymphoproliferative disorder following kidney transplantation: a population-based cohort study , TRI-OA-15-0322 in Revision

## **Danksagungen**

Ich danke meinem Doktorvater Professor Dr. med. Uwe Querfeld für die Betreuung der Arbeit. Der AG Peters für die Hilfe bei den Färbungen und Auswertungen. Linghua Kong für die Mikrochirurgie. Frau Sommer für die PCR Analyse und Uwe Hoff für die H-2Kb Färbungen.

Ich möchte außerdem Dr. med. Deepak Vangala und Dr. med. Andrea Döring für das Korrekturlesen und Benjamin Mommsen für die moralische Unterstützung danken.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und meiner Ehefrau für die allgegenwärtige Unterstützung.